

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) yang diperoleh dari wilayah Yogyakarta.

##### **2. Sampel**

Sampel pada penelitian ini yaitu emulgel gigi minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dengan variasi konsentrasi Na-CMC 2,4%-2,8% dan Gliserin 4%-8%.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama pertama, minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) yang diperoleh dari wilayah Yogyakarta.

Variabel utama kedua, emulgel gigi minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dengan variasi Na-CMC dan Gliserin.

Variabel utama ketiga, mutu fisik dan aktivitas antibakteri emulgel gigi minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) terhadap *S.mutans* ATCC 25175.

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung adalah beberapa kategori dari variabel utama yang telah ditentukan.

Salah satu variabel yang telah diubah secara sengaja untuk mengetahui dampaknya terhadap variabel tergantung disebut variabel bebas. Konsentrasi Na-CMC dan gliserin pada pembuatan emulgel gigi dengan minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) adalah variabel bebas dalam penelitian ini.

Variabel yang mempengaruhi variabel tergantung dikenal sebagai variabel kendali. Karena itu, variabel ini harus ditentukan apakah memenuhi syarat untuk mempengaruhi variabel tergantung agar peneliti lain dapat menggunakan temuan ini dengan benar. Kemurnian bakteri uji *S.mutans* ATCC 25175 adalah variabel kendali dalam penelitian ini. Kondisi laboratorium lainnya termasuk inkas, keseterilan alat dan bahan, media yang digunakan, metode destilasi, dan keseterilan bakteri.

Dalam penelitian ini, dua variabel bebas adalah kualitas fisik sediaan dan aktivitas antibakteri emulgel gigi minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC).

### 3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, minyak atsiri kulit jeruk purut yang dihasilkan adalah melalui proses destilasi metode water steam distillation dari kulit jeruk purut yang diperoleh dari toko Lansida Yogyakarta.

Kedua, konsentrasi masing-masing minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* Dc) yang diformulasikan kedalam bentuk emulgel gigi adalah 8%.

Ketiga, evaluasi mutu fisik sediaan emulgel gigi adalah uji organoleptik dengan menggunakan pancha indra (warna, bau, dan tekstur), uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan objek glass untuk dapat melihat susunan yang homogen dan tidak terdapat butiran kasar.

Keempat, evaluasi stabilitas fisik emulgel gigi dengan metode *cycling test* dengan pengamatan pH, pemisahan, viskositas.

Kelima, bakteri uji penelitian ini adalah *S.mutans* ATCC 25175 yang didapatkan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keenam, uji aktivitas antibakteri adalah pengujian menggunakan metode difusi cakram dengan sediaan yang dibuat dalam konsentrasi 8%, kontrol positif, kontrol negatif.

## C. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah minyak atsiri kulit buah jeruk purut, bakteri *S.mutans* ATCC 25175 yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi, Na-CMC, gliserin, tween 80, span 80, paraffin cair, nipagin, nipasol, serbuk MHA, NaCl 0,9%, darah kelinci, aquadest.

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, mortir dan stamfer, cawan poselin, timbangan analitik, gelas ukur, mikroskop, oven, mikropipet, incubator, jangka sorong, autoklaf, api bunsen, erlemeyer, gelas ukur, viscometer Brookfield DV-1 Prime, pH-meter, thermometer, cawan petri, ose, spiritus, beaker glass, pipet tetes, refractometer, *Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS).

## D. Jalannya Penelitian

### **1. Identifikasi minyak kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC)**

Tahap identifikasi yaitu menetapkan kebenaran sampel minyak kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) yang meliputi pemerian, kelarutan dalam etanol, bobot jenis (Bj), indeks bias dan Analisa GC -MS.

### **2. Analisa Minyak Atsiri**

**2.1 Pengamatan Organoleptik.** Pemeriksaan organoleptik meliputi pemeriksaan warna, bau dan rasa dari minyak atsiri secara visual.

- Pemeriksaan warna, dengan melihat langsung minyak atsiri hasil destilasi secara visual.
- Pemeriksaan bau, dengan mencium bau minyak atsiri yang menguap diatas kertas saring.
- Pemeriksaan rasa, dengan meneteskan minyak atsiri pada ujung lidah kemudian dibuang. (Lely, N., *et al.*,2017).

**2.2 Pengukuran Nilai Bobot Jenis Minyak Atsiri.** Minyak atsiri yang didapat ditentukan dengan menggunakan piknometer. Sebuah piknometer bervolume 50 ml yang telah dibersihkan dan dikeringkan dibebani kesimbangan logika. Nilai massa diperoleh dengan menghilangkan berat masing-masing piknometer yang mengandung salep peremajaan dari piknometer kosong (Lely, N., *et al.*,2017). Indeks bias dilakukan dengan menggunakan piknometer yang sudah kering dan bersih, kalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan, lalu dinginkan sampai suhu 25 °C. Masukkan cairan zat uji kedalam piknometer dengan mengatur suhu kurang lebih 20°C. piknometer yang berisi aquadest ditimbang dengan timbangan analitik, dan catat bobotnya, kemudian menghitung bobot jenis dengan perhitungan bobot zat dibagi sampel + bobot air, dalam piknometer (Depkes,2014).

**2.3 Pengukuran Nilai Indeks Bias.** Alat Refraktometer digunakan untuk mengukur indeks bias. Pertama, alkohol digunakan untuk membersihkan prisma refractometer, lalu dikeringkan. Kemudian, sampel yang akan diukur dimasukkan ke dalam prisma, dan pembacaan dilakukan (Inneke, 1995).

**2.4 Penetapan Kelarutan Dalam Etanol.** Penetapan kelarutan minyak atsiri dengan cara sebanyak 1 ml minyak atsiri diukur dengan menggunakan Gekas ukur 10 ml, kemudian ditambah etanol 96% sedikit demi sedikit, diamati hasil apakah minyak dapat larut atau tidak (Wibowo, D. P *et al.*, 2016).

**2.5. Analisa GC -MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*).** Penentuan komponen penyusun minyak kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dilakukan menggunakan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) merupakan alat yang digunakan untuk menganalisa senyawa berdasarkan pemisahan senyawa volatile berdasarkan reaksi fragmentasinya, sehingga dapat digunakan jenis komponen-komponen dalam senyawa termasuk berat molekul, rumus molekul, dan golongan senyawa yang dimiliki. Fase gerak yang digunakan adalah Helium, dilengkapi dengan Capillary column model number: Agilent DB-5MS (Panjang 30 m, ketebalan film 0,25 $\mu$ m, dan diameter dalam 0,25mm). Keadaan kerja memanfaatkan suhu pemanasan segmen 50C selama 5 menit, suhu infus 300C selama 17 menit, mode infus dengan proporsi split 129,9 dan gas pengangkut berupa helium dengan tegangan 24,7 kPa, all out stream 90,6 mL/menit, section aliran 0,66 mL/menit dan kecepatan langsung 29,5 setiap detik.

### 3. Formula Emulgel Gigi

**Tabel 4. Formulasi emulgel gigi minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC)**

<b>Komposisi</b>	<b>Formula</b>			
	<b>F1%</b>	<b>F2%</b>	<b>F3%</b>	<b>F4%</b>
Minyak atsiri kulit jeruk purut ( <i>Citrus hystrix</i> DC)	-	8	8	8
Na-CMC	2,6	2,4	2,6	2,8
Gliserin	6	8	6	4
Tween 80	1,4	1,4	1,4	1,4
Span 80	0,6	0,6	0,6	0,6
Paraffin cair	6,5	6,5	6,5	6,5
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	0,1	0,1	0,1	0,1
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Keterangan :

F1 : Kontrol negatif (sediaan pasta gigi gel tanpa minyak atsiri )

Kontrol positif : Sediaan pasta gigi herbal

F2 : Konsentrasi Na-CMC (2,6%), gliserin (6%).

F3 : Konsentrasi Na-CMC (2,4%), gliserin (8%).

F4 : Konsentrasi Na-CMC (2,8%), gliserin (4%).

### 4. Pembuatan Sediaan Emulgel Gigi

Semua bahan ditimbang menurut perhitungan. Kemudian, menggunakan aquadest panas, Na-CMC dikembangkan di mortir stamper. Kemudian masukkan gliserin,nipagin dan tween 80 dilarutkan diatas cawan porselin, kemudian dilebur di atas *water bath* aduk hingga homogen (fase air). Nipasol, span 80, paraffin cair dipanaskan menggunakan cawan porselin diatas water bath (fase minyak). Fase air

dan minyak dicampur ad homogen. Kemudian tambahkan basis Na-CMC Minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) tidak ditambahkan ke basis, tetapi ke formula kedua dan keempat ditambahkan.

### **5. Pengujian Sifat Fisik Sediaan Emulgel Gigi**

**5.1 Organoleptis.** Pengujian organoleptik dilakukan dengan persepsi visual terhadap bentuk, aroma dan warna dari perencanaan emulgel gigi (Warnida, Juliannor, & Sukawaty, 2016).

**5.2 Homogenitas.** Pengujian diakhiri dengan mengaplikasikan bahan atau kesiapan untuk dicoba pada suatu kaca, misalnya kaca arloji atau bahan lain yang wajar sehingga dapat memperlihatkan sintesis yang homogen dan tidak ada butiran yang kasar (Warnida, Juliannor, & Sukawaty, 2016).

**5.3 Daya Sebar.** Sampel yang beratnya 0,5 gram diletakkan pada kaca dan digantung rapat selama 1 saat. Luas contoh olesan tersebut diperkirakan, kemudian pada saat itu ditambahkan timbunan 50, 100, 150 dan 250 gram dan didiamkan selama 1 menit, lebarnya diperkirakan berturut-turut (Warnida, Juliannor, & Sukawaty, 2016).

**5.4 Uji Tipe Emulsi.** Uji jenis emulsi dilakukan dengan cara meneteskan 1 tetes larutan kesiapan pada drop plate dan menambahkan 1 tetes susunan Sudan III lalu memperhatikannya. Jika warna merah pada tahap luarnya homogen, jenis emulsinya adalah air dalam minyak (W/O). Jika satu tetes perencanaan diteteskan pada plat trickle dan ditambahkan satu tetes larutan metilen biru, warna biru yang homogen akan terlihat di bawah kaca pembesar. Jenis emulsinya adalah minyak dalam air (O/W) (Larasati *et al.*, (2023)).

**5.5 pH.** Untuk menguji pH emulgel gigi, alat pH meter dicelupkan pada sediaan emulgel gigi. pH setiap sediaan emulgel gigi diukur dan dicatat.

**5.6 Uji Daya Busa.** Memasukkan 1 gram pasta gigi ke dalam gelas penduga berukuran 50 mililiter dan larutkan dengan 10 mililiter air sulingan, kemudian kocok beberapa kali, lalu ukur daya buih yang terbentuk (Wardani dan Safitri, 2019). Dengan menggunakan mistar, Anda dapat mengukur tingkat busa pada sediaan pasta gigi (Marlinadan Rosalini, 2017). Replikasi tiga kali pada setiap.

**5.7 Uji viskositas.** Penilaian konsistensi dilakukan dengan menggunakan viskometer stomer. Uji konsistensi kesiapan dilakukan dengan cara memasukkan batang viskometer ke dalam perencanaan yang

telah ditempatkan pada alat ukur gelas. Ketebalan kesiapan terlihat pada skala di perangkat setelah pengamanan tercapai. Angka yang menunjukkan ketebalan pada alat merupakan konsistensi yang kemudian ditemukan pada tabel ketebalan stomer (Pratiwi, 2016).

**5.8 Uji stabilitas.** Metode uji roda gigi digunakan untuk menguji stabilitas. Pasta gigi disimpan pada suhu  $\pm 4$  °C selama satu hari dan kemudian disimpan pada suhu  $\pm 40$  °C selama satu hari berikutnya. Selama enam siklus pengujian, perubahan fisik seperti pemisahan, pH, dan viskositas diamati (Suryani *et al.*, 2017).

## 6. Sterilisasi

Ujungnya dibakar di atas api bunsen hingga mengkilat untuk membersihkan peralatan seperti silinder, jarum, dan spatula. Bersihkan cawan petri dan pipet volume dengan broiler pada suhu 160 hingga 170 derajat Celcius selama 1-2 jam. Autoklav digunakan untuk membersihkan tabung reaksi bertutup dan erlemeyer dengan suhu 121°C dan tekanan antara 15-17,5 psi (*pund per square inci*) (Kharisma, A., & Manan, A., 2012).

## 7. Pembuatan Media Uji

**7.1 Pembuatan media Nutrient Agar (NA).** Agar serbuk nutrisi dapat dilarutkan dalam aquades, aduk serbuk nutrisi dengan aquades sambil diaduk sampai semuanya halus. Media dibersihkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 1,5 atm (Hudaya *et al.*, 2014).

**7.2 Pembuatan media Mueller Hinton Agar (MHA).** Serbuk mueller hinton dilarutkan dengan aquades dan dilakukan pemanasan sambil diaduk hingga homogen. Media dilakukan sterilisasi dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 1,5 atm (Hudaya *et al.*, 2014).

**7.3 Pembuatan Media Agar Darah.** Serbuk NA adilarutkan dengan aquadest dan dipanaskan gram sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer hingga homogen. Media dilakukan sterilisasi dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Cairkan media NA pada tabung reaksi kemudian ditambahkan darah kelinci 2-3 tetes dan vortex. Tuang media pada cawan petri tunggu hingga memadat.

## 8. Peremajaan Bakteri Uji

Dengan mengoreskan bakteri *S.mutans* ATCC 25175 secara perlahan pada media agar darah, bakteri murni diambil dengan jarum ose

steril sebanyak 1-2 ose. Hasil dari goresan diinkubasi menggunakan incubator selama 24 jam pada suhu 37°C (Hassanudin & Salinus, 2020).

### **9. Identifikasi Bakteri *Streptococcus Mutans* ATCC 25175**

**Pertama**, Mikroba S.mutans ATCC 25175 ditemukan pada agar darah. Media ini ditetaskan selama 18 hingga 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, ia berubah menjadi endapan putih dengan tepi hijau.

**Kedua**, Organisme mikroskopis *S.mutans* ATCC 25175 dibedakan menggunakan teknik pewarnaan Gram. Pertama-tama oleskan pada benda kaca, kemudian pada titik tersebut difiksasi, kemudian warnai Gram A dengan batu mulia violet yang diteteskan selama 1 saat, kemudian dicuci, kemudian noda Gram B dengan jawaban KI dan I2 diteteskan selama 1 saat. Setelah itu, gram C diwarnai dengan etanol yang diteteskan sebagai deterjen selama tiga puluh detik, kemudian dicuci. Gram D diwarnai dengan safranin selama satu menit, kemudian dicuci, dikeringkan, dan dilihat dengan lensa pembesar. Pewarnaan dapat menunjukkan bahwa mikroba gram positif *S.mutans* ATCC 25175 ditemukan, jika hasilnya berbentuk kokus atau bulat, berwarna ungu, dan disusun dalam kolom seperti rantai.

**Ketiga**, bakteri *S.mutans* ATCC 25175 diidentifikasi dengan metode biokimia. Ada dua pengujian, yaitu pengujian katalase dan koagulase. Uji katalase dapat dilakukan dengan mencampurkan 0,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dengan 1 porsi mikroba *S.mutans* ATCC 25175, hasilnya positif dengan asumsi adanya kantong udara atau struktur buih. Untuk menguji koagulase, 0,5 mililiter plasma dengan satu porsi kultur bakteri dibuat dan kemudian dibrooding selama 1-4 jam pada suhu 37 derajat Celcius. Hasil yang positif dengan penjendalan (Agustie, A. W. D., & Samsumaharto, R. A. 2013).

### **10. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175**

Tujuan dari membuat suspensi bakteri uji adalah untuk mengetahui berapa banyak bakteri yang akan digunakan untuk uji aktivitas, menggunakan standar Mc Farland 0,5. Mikroba uji yang telah direstorasi pada media agar miring kemudian diambil dengan jarum silinder steril, dan kemudian disuspensikan ke dalam silinder yang berisi 5 mililiter susunan natrium klorida 0,9% (0,09 gram serbuk natrium klorida dicampur dengan 10 mililiter air). Proses ini berlanjut sampai kekeruhan mencapai standar kekeruhan yang diperoleh pengaturan Mc. Farland 0,5. Kekeruhan suspensi bakteri uji standar adalah 0,5 standar

McFarland, yang sebanding dengan suspensi sel bakteri dengan sentralisasi 1,5 kali 108 CFU/mL (Bempa, S. L. P. 2016).

## **11. Pengujian Aktivitas Antibakteri**

Emulgel gigi yang diperoleh dari formulasi minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) diuji mikrobiologi pada bakteri *S.mutans* ATCC 25175. Metode yang dipakai adalah pengujian difusi cakram. Tujuan pengujian difusi cakram yaitu menentukan zona hambat yang terjadi dikonsentrasi minyak atsiri dan sediaan emulgel. 3 cawan petri diameter 14 cm serta 18 kertas cakram diameter 8 mm dipakai dalam uji aktivitas antibakteri. Semua cawan petri diisi dengan media cair MHA 30 mililiter, dan biarkan media mengeras pada suhu kamar. Setelah kapas pentul steril dicampur ke dalam suspensi bakteri, tutup rapat media MHA dengan kapas pentul. Diamkan selama lima menit untuk memastikan suspensi meresap ke dalam media. Cara yang paling umum dilakukan yaitu memercikkan kertas lingkaran pada 4 persamaan uji, 1 resep pemeriksaan kontrol negatif dan 1 kontrol positif, diamkan beberapa detik kurang lebih 15 menit hingga susunannya tersebar pada kertas piring. Lingkaran kertas yang telah diserap setiap persamaannya disambungkan ke masing-masing cawan petri yang baru diberi nama. Diulang sebanyak 3x, cawan petri dibroying selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Diameter zona hambat sekitar kertas cakram diukur dan dinyatakan dalam satuan milimeter. Area jernih yang menunjukkan penghambatan oleh pasta gigi minyak atsiri kulit jeruk purut menunjukkan hasilnya (*Citrus hystrix* DC) terhadap bakteri *S.mutans* ATCC 25175. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

## **12. Pengamatan Pengujian Efek Antibakteri**

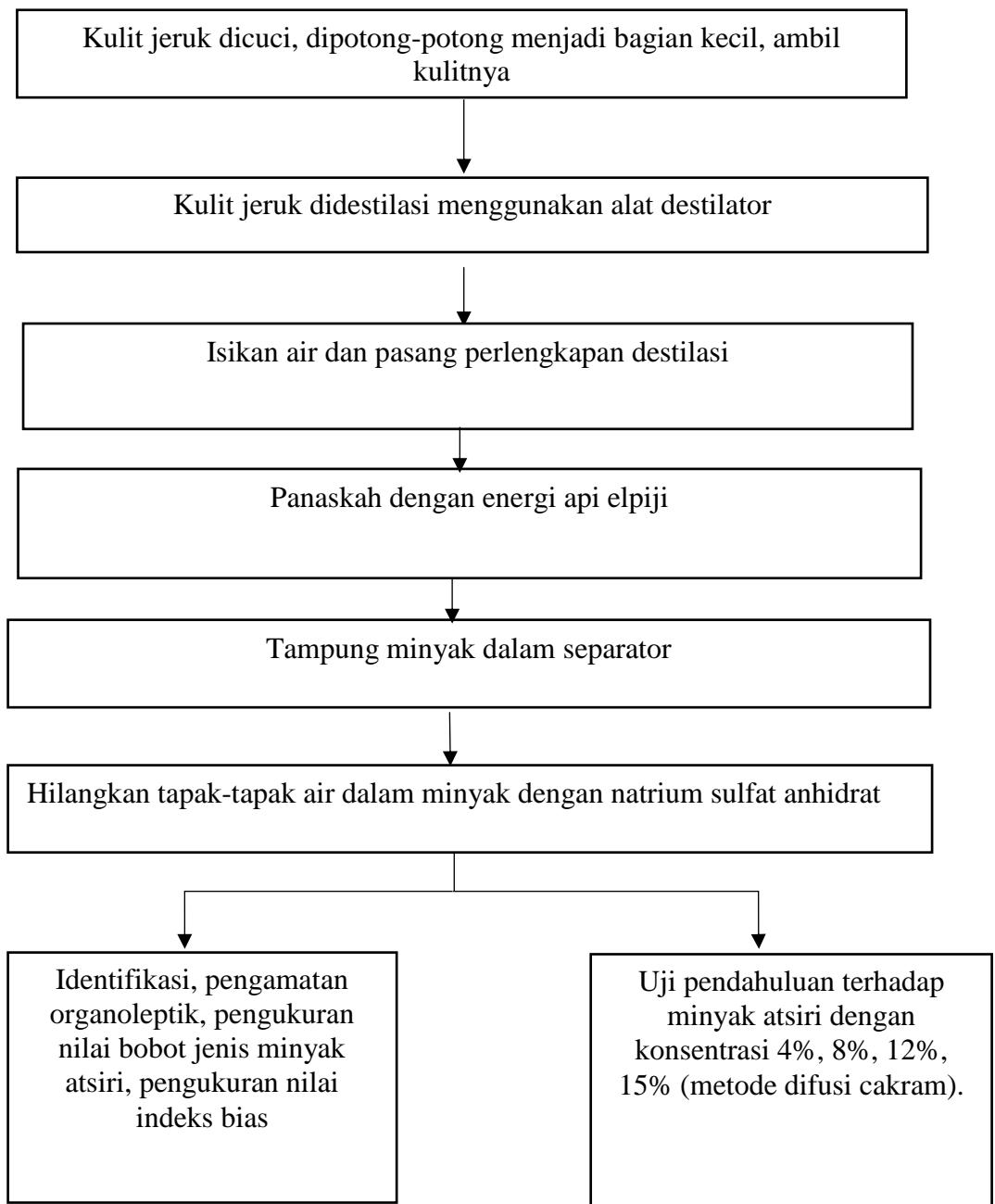
Pengamatan dilakukan setelah 1x24 periode penetasan. Daerah masuk akal berarti kesadaran mikroorganisme terhadap antitoksin atau zat antibakteri lain yang digunakan sebagai bahan uji, ditunjukkan dengan lebar pengukuran zona penghalang. Lebar zona pengekangan diperkirakan dalam milimeter (mm) dengan menggunakan aturan skala. Kemudian pada titik tersebut lebar zona penghalang disusun sebagai kekuatan antibakteri berdasarkan tatanan Davis dan Heavy.

### E. Analisis Hasil

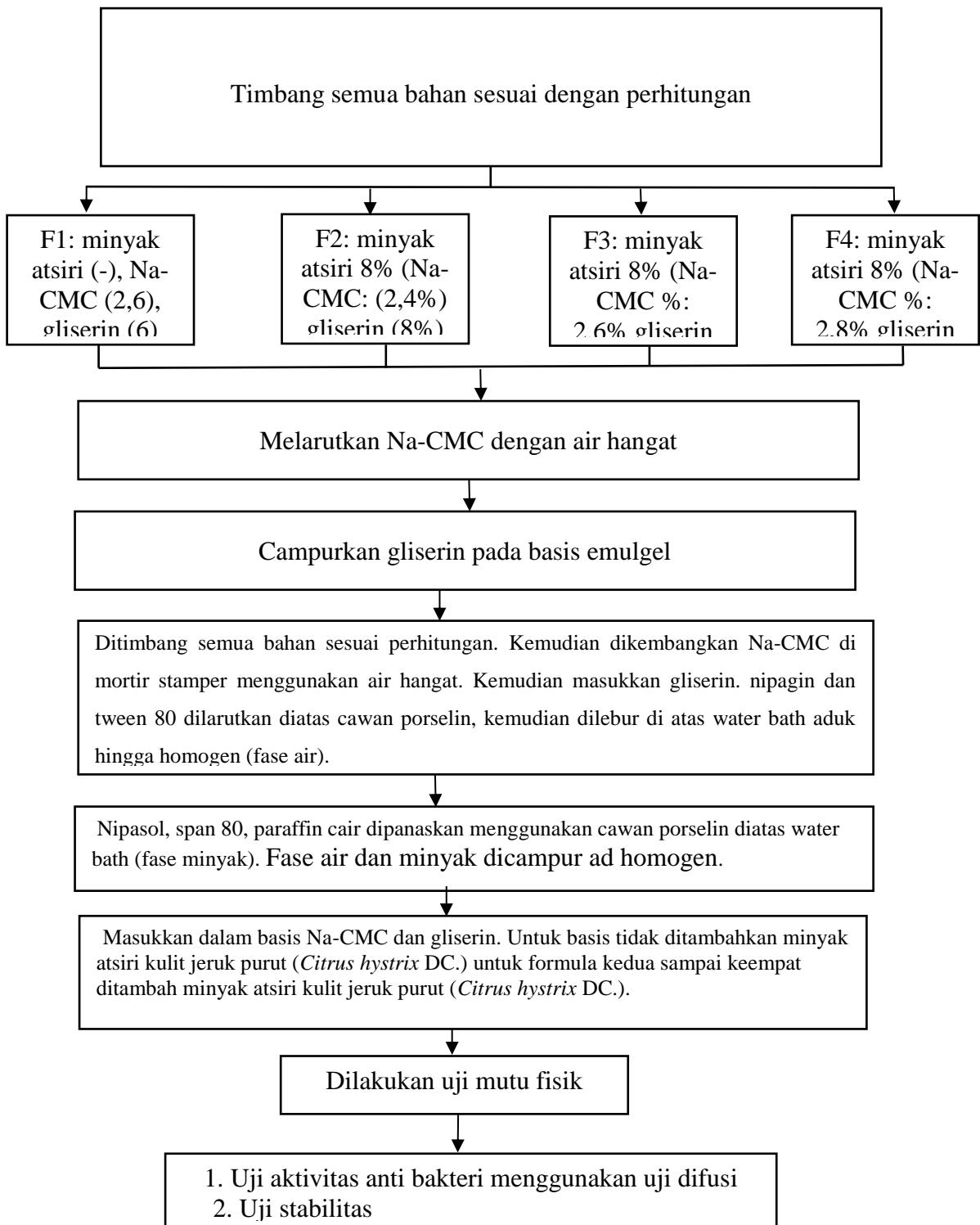
Informasi yang diperoleh berupa karakteristik aktual seperti homogenitas, organoleptik, ketebalan, pH, daya sebar, tingkat buih, daya hambat antibakteri. Uji homogenitas dan organoleptik bergantung pada persepsi yang berbeda. Data hasil pengujian viskositas, pH, daya sebar serta uji tinggi busa dianalisis dengan SPSS memakai analisis *Shapiro Wilk*. Jika didapat data berdistribusi normal dilanjut analisis *paired samples t-test*. Data daya hambat antibakteri dianalisis dengan SPSS menggunakan analisis Shapiro Wilk; jika data berdistribusi tidak normal, analisis Wilcoxon digunakan; jika data berdistribusi normal, analisis one-way anova digunakan; dan jika data berdistribusi tidak normal, analisis Kruskal-wallis digunakan.

### F. Skema Jalannya Penelitian

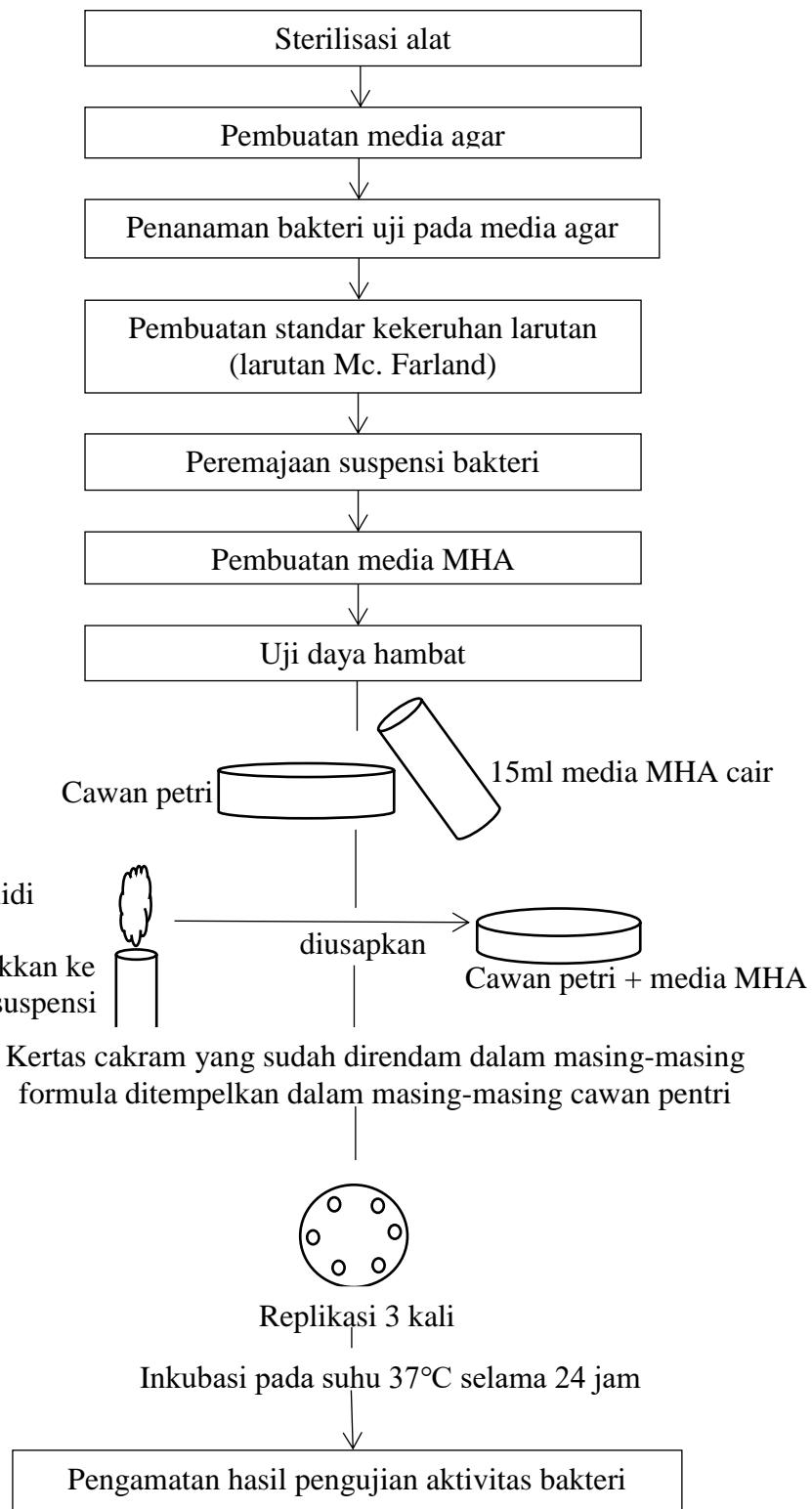
Gambar 7 menunjukkan proses pembuatan pasta gigi gel minyak atsiri kulit jeruk purut dan gambar 8 dan 9 menunjukkan proses uji aktivitas antibakteri terhadap S.mutans ATCC 25175.



**Gambar 6. Pembuatan minyak atsiri kulit jeruk purut (*Citrus hystrix* DC)**



Gambar 7. Pembuatan emulgel gigi



**Gambar 8. Pengujian aktivitas anti bakteri**