**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

**3.1 Rancangan Penelitian**

Metode penelitian ini dilakukan secara eksperimental, rancangan penelitian meliputi pengumpulan dan penyiapan sampel, pembuatan ekstrak etanol daun senduduk, skrining fitokimia, formulasi obat kumur dan uji aktivitas antibakteri sediaan obat kumur terhadap *streptococcus mutans.*

**3.1.1 Variabel Penelitian**

Variabel penelitian ini terdiri dari variabel babes dan variabel terikat. Variabel bebas adalah konsentrasi daun senduduk pada sediaan obat kumur. Sedangkan variable terikatnya adalah uji fisik dan uji aktivitas antibakteri.

**3.1.2 Parameter Penelitian**

Parameter pada penelitian ini adalah uji organoleptis, uji pH, Uji viskositas, uji hedonik dan daya hambat bakteri.

**3.2 Jadwal Dan Lokasi Penelitian**

**3.2.1 Jadwal Penelitian**

Penelitian dilakukan bulan Februari

**3.2.2 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan diLabroratorium Terpadu Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-washliyah

**3.3 Bahan Dan Alat**

**3.3.1 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penlitian ini adalah daun senduduk (*Melastoma* malabathricum *L)*, Nutrient Agar (NA), kalium iodide, iodium, aquadest, bismuth, (II) nitrat, asam asetat glacial, asam sulfat p, asam klorida, raksa (II) klorida, asam anhidrat, natrium hidroksida, peppermint oil, gom arab, klorahidrat, sorbitol, alfa-naftol, kloroform, metanol, etanol 96%, n-heksana, serbuk magnesium, toluen.

**3.3.2 Peralatan**

Alat-alat yang digunakan adalah alat maserasi, rotary evaporator, incubator, cawan petri, alat-alat gelas kimia, jangka sorong, autoklaf, kawat ose, oven, lampu spiritus, penangas air, cakram kertas, lemari pengering, timbangan analitik digital.

**3.4 Pembuatan Larutan Pereaksi**

### **3.4.1 Larutan Pereaksi HCL (e)**

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat dimasukkan kedalam beaker glass dan dicukupkan dengan Aquadest sampai 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.4.2 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N**

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat dimasukkan kedalam beaker glass dan dicukupkan dengan Aquadest sampai 100 ml (Depkes RI, 1995).

### **3.4.3 Larutan Pereaksi Mayer**

Sebanyak 1,35 gram raksa (lll) klorida dilarutkan dalam 60 ml air suling. Kemudian pada wadah lain ditimbangkan sebanyak 5 gram kalium iodida dilarutkan dalam 10 ml air suling, kemudian keduanya di campurkan dan ditambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 ml (Depkes, 1995).

### **3.4.4 Larutan Pereaksi Bouchardat**

Sebanyak 4 gram kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml aquadest, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 gram iodium dan dicukupkan dengan aquadest hingga 100 ml (Ditjen POM, 1995).

### **3.4.5 Larutan Pereaksi Dragendroff**

Ditimbang Bismuth subnitrat sebanyak 0,85 gram dilarutkan dalam campuran 10 ml asam asetat glasial dan 40 ml aquadest. Di tempat lain 8 gram KI dilarutkandalam20mlaquadest.Kedualarutanyangtelahdibuatdicampurkemudiandiencerkandenganaquadestsampaivolumenya 100ml.(DepkesRI,1995).

### **3.4.6 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%**

Sebanyak 1 gram besi (III) klorida dilarutkan dengan aquadest hingga 100 ml (Ditjen POM, 1995).

### **3.4.7 Larutan Pereaksi Lieberman-Buchard**

Asam asetat anhidriat sebanyak 20 ml dipipet lalu dicampurkan dengan 1 ml asam sulfat pekat dalam beaker glass (Depkes RI, 1995).

**3.5 Pengambilan Dan Pengolahan Tumbuhan**

**3.5.1 Identifikasi Sampel**

Identifikasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Herbarium Mednense (MEDA) Universitas Sumatera Utara, identifikasi dilakukan bertujuan untuk memastikan kebenaran tumbuhan yang akan digunakan sebagai bahan uji.

**3.5.2 Pengumpulan Sampel**

Pengumpulan sampel dilakukan secara purposive tanpa membandingkan dengan tumbuhan yang sama dari daerah lain. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun senduduk yang diambil dari sekitar wilayah Gunung Tua. Daun yang diambil sebagai sampel keseluruhan dari daun tumbuhan yang masih dalam keadaan segar.

**3.6 Pembuatan Simplisia**

Daun senduduk segar yang telah dikumpulkan, disortasi basah untuk memisahkan daun senduduk dari bagian tumbuhan yang terikat, kotoran atau bahan asing lainnya, lalu dibersihkan dari kotoran yang melekat. Pencucian dilakukan dengan air keran yang mengalir, lalu ditiriskan dan ditimbang. Setelah itu sampel dikeringkan dilemari pengering dengan suhu 40-50°c. Setelah kering dilakukan sortasi kering untuk memisahkan benda-benda asing seperti penotoran yang terjadi selama pengeringan atau adanya simplisia yang busuk. Setelah disortasi kering, ditimbang kembali. Simplisia kering dihaluskan menggunakan blender hingga halus, setelah itu diayak dengan ayakan mesh 60 hingga diperoleh serbuk simplisia (Depkes, 1989).

**3.7 Karakteristik Simplisia**

**3.7.1 Penetapan Kadar Air**

 a. Penjenuhan toluene

 Sebanyak 200 ml, toluene dimasukkan kedalam labu alas bulat, lalu ditambahkan 2 mL air suling, kemudian alat dipasang dan dilakukan detilasi selama 2 jam, sampai tetesan air ke dalam tabung penerima telah habis. Detilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama ±30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca sebgai volume air awal dengan ketelitian 0,05 mL maka diperoleh toluene jenuh, diambil sedikit untuk membilas alat.

b.Perlakuan sampel

 Kemudian dalam labu yang terisi toluen jenuh tersebut dimasukkan 5 gram serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama kemudian dipanaskan hati-hati selama 15 menit, setelah toluene mendidih, kecepatan tetsan diatur 2 tetesan perdetik sampai sebagian besar alat terdetilasi, kemudian kecepatan detilasi dinaikkan sampai 4 tetes/ detik. Setelah air terdetilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluene jenuh. Destilasi dilanjutkkan selama 3 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar setelah air dan toluene memisah sempurna. Volume air dibaca sebagai volume air akhir dengan ketelitian 0,05 ml. Selisih kedua volume air dihitung sebagai kandungan air yang terdapat dalam sampel yang diuji (Depkes RI, 1989).

% kadar air simplisia = $\frac{volume air akhir-volume air awal}{berat sampel} x 100\%$

**3.7.2 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air**

Ditimbang 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml air-kloroform (2,5 kloroform dalam air suling sampai 1 liter) dalam labu Erlenmeyer tertutup sambil dikocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudiaan dibiarkan selama 18 jam, disaring, sejumlah 20 ml filtrate pertama diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang telah dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

Kadar sari larut air = $\frac{(Berat sari)x pengenceran}{berat sampel} x 100\%$

**3.7.3 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol**

Ditimbang 5 gram serbuk simplisia yang telah dikeringkan diudara dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml etanol 96% dalam labu Erlenmeyer tertutup sambil dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama kemudian dibiarkan selam 18 jam. Kemudian disaring, sebanyak 20 ml filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan dangkal berdasarkan rata yang telah ditara dan sisanya di panaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

Kadar sari larut dalam etanol = $\frac{\left(berat sari\right)x pengenceran}{berat sampel} x 100\%$

**3.7.4 Penetapan Kadar Abu Total**

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia ditimbang seksama, dimasukkan kedalam krus porselin yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian diratakan, dankrus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pemijaran dilakukan pada suhu 500-600°C selama 3 jam kemudian didinginkan dan ditimbang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

Kadar abu total = $\frac{(berat abu)}{berat sampel} x 100\%$

**3.7.8 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam**

 Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total ditambahkan dengan 25 ml asam klorida encer dan didihkan selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, kemudian disaring dengan kertas saring dan dipijarkan pada suhu 500-600°C sampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap sampel yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

Kadar abu tidak larut asam = $\frac{(berat abu)}{berat sampel} x 100$%

**3.8 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun senduduk**

Pembuatan ekstrak dilakukan secara maserasi dengan menggunakan simplisia daun senduduk (*Melastoma malabathricum*, L.) yang telah diserbukkan dengan cara: serbuk simplisia 10 bagian (500 gram) dimasukkan ke dalam bejana, kemudian dituangkan dengan 75 bagian (3750 ml) cairan penyari etanol lalu ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya matahari sambil diaduk sesekali. Kemudian diserkai dan ampasnya diperas kemudian dicuci dengan 25 bagian (1250 ml) cairan penyari etanol sehingga diperoleh 100 bagian (5000 ml). Pindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk terlindung dari cahaya selama 2 hari, enap tuangkan. Maserat lalu di pekatkan dengan rotary evaporator dan diperoleh ekstrak kental (Ditjen POM, 1979).

**3.9 Skrining Fitokimia**

 Pemeriksaan skrining fitokimia serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun Senduduk untuk mengetahui golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, glikosida, steroid/terpenoid dan tanin.

**3.9.1 Pemeriksaan Alkaloid**

serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun senduduk masing-masing ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 ml, asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas penangas air selamat 2 menit, didinginkan dan disaring, filtrat digunakan untuk pengujian berikut:

1. filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.

2. filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.

3. filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendroff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna jingga.

 Alkaloid dikatakan positif jika terjadi endapan atau kekeruhan paling sedikit 2 reaksi dari 3 percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

**3.9.2 Pemeriksaan Saponin**

Sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun senduduk masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5ml air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat. Adanya saponin ditunjukkan dengan timbulnya busa setinggi 1-10 cm selama ± 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

**3.9.3 Pemeriksaan Tanin**

Sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun senduduk masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 10 ml air suling dan dididihkan selama 3 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan 1-2 tets pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terjadi warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Depkes RI, 1995).

**3.9.4 Pemeriksaan Triterpenoid/Steroid**

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun senduduk masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 20 ml eter, kemudian disaring. Filtrat yang di dapat diuapkan dalam cawan penguap sampai kental. Ke dalam residu ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (larutan pereaksi Liebarmann-Bouchard). Terbentuknya warna biru atau biru hijau menunjukkan adanya steroid, dan warna merah muda atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Depkes RI, 1995).

**3.9.5 Pemeriksaan Flavonoid**

Sebanyak 10 gram serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun senduduk masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan kemudian disaring dalam keadaan panas. Ke dalam 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alcohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Dpkes RI, 1995).

**3.9.6 Pemeriksaan Glikosida**

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 3 gram lalu disari dengan 30 ml campuran etanol 95% dengan aquadest (7:3), di refluks selama 2 jam, didinginkan dan disaring. Diambil 20 ml filtrate ditambahkan 25 ml air dan 25 ml timbale (II) asetat 0,4 M kemudian dikocok, didiamkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat disari 3 kali, masing-masing dengan 20 ml campuran klorofom dan isopropanolol (3:2). Sari dikumpulkan dan diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50°C, sisa penguapan di larutkan dengan 3 ml methanol.

Larutan sisanya digunakan untuk percobaan sebagai berikut : 0,1 ml larutan sisa dimasukkan ke dalam tabung reaksi, diuapkan diatas penangas air, pada sisa di tambahkan 2 ml aquadest dan ditambahkan 5 tetes larutan pereaksi molisch. Ditambahkan hati-hati 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Glikosida positif apabila terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas kedua cairan (Depkes RI, 1995).

**3.10 Pembuatan Sediaan Obat Kumur Ekstrak Etanol Daun Senduduk**

Sediaan obat kumur diformulasikan dengan susunan formula sebagai berikut:

**Tabel 3.1** Formula Obat Kumur

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Bahan | FormulaEEDS 2,5 % | FormulaEEDS 5 % | Formula EEDS 7,5 % |
| Ekstrak daun senduduk (g) | 2,5 | 5 | 7,5 |
| Pepermint oil (ml) | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Sorbitol (ml) | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Na-Benzoat (g) | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Gliserin (ml) | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Aqudes (ml) | Ad 100 | Ad 100 | Ad 100 |

**Keterangan:**

FI : Formulasi sediaan obat kumur dengan ekstrak daun senduduk 2,5%

F2 : Formulasi sediaan obat kumur dengan ekstrak daun senduduk 5%

F3 : Formulasi sediaan obat kumur dengan ekstrak daun senduduk 7,5%

Cara pembuatan:

 Sediaan obat kumur ekstrak daun senduduk dengan cara ekstrak daun senduduk, pepermint oil, sorbitol, Na-Benzoat, gliserin, aquadest ditimbang sesuai formulasi. Kemudian ekstrak daun senduduk dimasukkan ke dalam mortir, kemudian ditambah gliserin, digerus hingga larut. Kemudian ditambahkan sorbitol dan Na-Benzoat ke dalam mortir dan digerus kembali hingga homogen. Ditambahkan aquades ke dalam mortir hingga bisa dituang, kemudian disaring dan dimasukkan ke dalam botol, kemudian ditambahkan sisa aquades hingga 100 mL. Kemudian ditambahkan pepermint oil ke dalam botol.

**3.11 Evaluasi Sediaan Obat Kumur Ekstrak Etanol Daun Senduduk**

**3.11.1 Uji Organoleptis**

Pengematan organoleptis sediaan obat kumur yaitu melakukan pengamatan secara visual langsung meliputi warna, bau,dan bentuk pada sediaan yang dihasilkan.

**3.11.2 Uji pH**

Penentuan pH dilakukan dengan menggunakan pH meter sebagai berikut : alat terlebih dahulu dikalibrasi dengan menggunakan larutan dapar standart netral (pH 7,01) dan larutan dapar pH asam (4,01) sehingga posisi jarum menunjukkan harga pH tersebut diatas. Kemudian elekrtoda dicuci dengan air suling, dan dikeringkan dengan kertas tissue. Kemudian elektroda dicelupkan dalam bahan uji, jarum dibiarkan bergerak sampai posisi konstan. Angka yang ditunjukkan pH meter merupakan harga pH sediaan (Wasitaatmadja, 1997)

**3.11.3 Pengamatan Viskositas**

Uji Viskositas Uji viskositas menggunakan viscometer Brookfield, dalampengerjaannya, sampel dimasukkan ke dalam wadah sampai batas pencelupan dan rotor dijalankan. Viskositas diukur menggunakan spindle L2 dengan kecepatan 50 rpm (Yuniarti, 2022).

**3.11.4 Uji Hedonik**

 Dilakukan dengan sampling acak dengan populasi sejumlah 20 orang mengisi data angket yang sudah disediakan, setiap orang mendapatkan kesempatan yang sama untuk merasakan sampel. Uji hedonik bertujuan untuk mengevaluasi daya terima atau tingkat kesukaan panelis terhadap produk yang dihasilkan. Siklus hedonik yang digunakan berkisar antara 1-5 dimana, (1) Sangat tidak suka, (2) Tidak suka, (3) Kurang suka, (4) Suka, (5) Sangat suka (Rahayu, 2016).

## 3.12 Uji Aktivitas Antibakteri Obat Kumur Ekstrak Etanol Daun Senduduk

**3.12.1 Strelisasi Alat**

Sterilisasi dilakukan dengan cara yang sesuai terhadap masing-masing alat. Alat-alat yang disterilkan harus dalam keadaan bersih dan kering.Tabung reaksi, cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer dibungkus dengan kertas perkamen dan diikat dengan benang wol, kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu 180ºC selama 1 jam. Pinset dan jarum ose disterilkan dengan cara dipijarkan pada nyala bunsen (Afni, 2015).

### **3.12.2 Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)**

Ditimbang sebanyak 5,6 gram Nutrient Agar, kemudian dilarutkan dalam 200 ml aquadest menggunakan erlenmeyer. Dihomogenkan di atas hotplate samapi media Nutrient Agar benar-benar larut.Larutan tersebut kemudian distrerilkan di autoklaf dengan suhu 121ºC selama 30 menit.Disimpan pada lemari pendingin, dan dipanaskan kembali di hotplate ketika digunakan (Afni, 2015).

### **3.12.3 Peremajaan Bakteri Streptococcus mutans**

Di dalam cawan petri dituang media Nutrient Agar (NA) sebanyak 15 ml, dibiarkan pada suhu ruang sampai memadat. Bakteri uji *Streptococcus mutans* yang berasal dari biakan murni diambil dengan jarum ose yang sudah dipijarkan di nyala bunsen, kemudian diinokulasi dengan cara digoreskan pada media Nutrient Agar (NA). Kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37ºC. Diamati pertumbuhan bakterinya (Afni, 2015).

**3.12.4 Pembuatan Suspensi *Streptococcus mutans***

Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diremajakan diambil dengan jarum ose yang telah dipijarkan di nyala bunsen. Kemudian disuspensikan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 0,9% sampai didapat kekeruhan suspensi bakteri yang sama dengan kekeruhan standar *Mc.Farland* dengan konsentrasi 108 CFU/ml (Afni, 2015).

### **3.12.5 Uji Antibakteri Obat Kumur Ekstrak Daun Senduduk**

Uji antibakteri sediaan obat kumur ekstrak etanol daun senduduk dilakukan dengan metode sumuran. Sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri diambil dengan mikropipet, kemudian dituangkan diatas cawan petri. Kemudian ditambahkan 15 ml media Na, dicampurkan dengan cara membuat angka delapan sampai 15 kali. Dibiarkan pada suhu ruang sampai media memadat. Media yang telah memadat dibuat lubang yang diatur jaraknya, kemudian pada masing-masing lubang dimasukkan 0,1 ml sediaan obat kumur dengan berbagai konsentrasi (2,5%, 5%, dan 7,5%), sediaan yang beredar di pasaran sebagai pembanding (Listerine) dan dasar sediaan sebagai blanko. Kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37ºC. Setelah 24 jam diukur diameter zona hambat di sekitar lubang dengan menggunakan jangka sorong. Pengujian masing-masing dilakukan 3kali pengulangan (Dirjen POM, 1995).