

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Adapun rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design*, dimana satu kelompok bertindak sebagai kontrol dan kelompok lain sebagai eksperimen. Kelompok yang diberikan perlakuan disebut kelompok eksperimen yaitu pemberian formula obat kumur pada media agar yang telah dibiakkan bakteri *Streptococcus mutans* sedangkan kelompok kontrol dibagi menjadi dua, yaitu kontrol positif (obat kumur komersil Clorhexidine) dan kontrol negatif yaitu basis formula obat kumur yang tidak mengandung bahan aktif ekstrak biji kopi robusta sangrai.

3.2. Populasi, Sampel, dan Teknik Sampling

3.2.1. Populasi Penelitian

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau objek yang diteliti (Notoatmodjo, 2012). Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah kopi varietas robusta (*Coffea canephora*) yang dijual di Wonosobo.

3.2.2. Sampel Penelitian

Sampel adalah objek yang diteliti dan dianggap mewakili seluruh populasi (Notoatmodjo, 2012). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kopi robusta sangrai (*Coffea canephora*) yang dijual di Kecamatan Kepil, Kabupaten Wonosobo.

3.2.3. Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Purposive Sampling* yaitu teknik dimana sampel dipilih berdasarkan pertimbangan tertentu dengan tujuan untuk memperoleh satuan sampling yang memiliki karakteristik atau kriteria yang dikehendaki dalam pengambilan sampel. Kriteria sampel yang dikehendaki yaitu dengan mempertimbangkan kriteria inklusi, diantaranya jenis kopi robusta, biji kopi sangrai, dan dijual di Kecamatan Kepil, Kabupaten Wonosobo.

3.3. Tempat dan Waktu Penelitian

3.3.1. Tempat

- a. Tempat pengambilan sampel dilakukan di Wonosobo, Jawa Tengah.
- b. Tempat penelitian di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Sahid Surakarta.

3.3.2. Waktu

Waktu pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan November 2020-April 2021.

3.4. Variabel Penelitian

Variabel merupakan ukuran atau ciri yang dimiliki oleh anggota-anggota suatu kelompok yang berbeda dengan yang dimiliki kelompok lain (Notoatmodjo, 2012).

a. Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah formula obat kumur ekstrak etanol biji kopi robusta sangrai (*Coffea canephora*).

b. Variable Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah kekuatan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

c. Variabel Terkendali

- 1) Sterilisasi alat dan bahan (*Autoclave*)
- 2) Medium *Nutrien Agar* (NA) sebagai media pertumbuhan bakteri
- 3) Medium *Nutrien Broth* (NB)
- 4) Medium *Muller Hinton Agar* (MHA)
- 5) Suhu penyimpanan

3.5. Definisi Operasional Variabel

- a. Ekstrak etanol biji kopi Robusta sangrai (*Coffea canephora*) adalah ekstrak yang diperoleh dari serbuk biji kopi robusta sangrai, lalu dimaserasi dalam etanol 96%, kemudian dievaporasi sampai didapat ekstrak kental.
- b. Obat kumur ekstrak biji kopi robusta sangrai merupakan sediaan cair untuk kumur yang mengandung ekstrak etanol biji kopi robusta sangrai dan beberapa eksipien yaitu xylitol, gliserin, natrium benzoat, metil paraben, propil paraben, dan aquadest.
- c. Suspensi *Streptococcus mutans* merupakan larutan yang mengandung biakan bakteri *S. mutans*.
- d. *Muller Hinton Agar* (MHA) merupakan media yang digunakan untuk mengamati daya hambat ekstrak etanol biji kopi robusta sangrai terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

- e. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar. Difusi agar merupakan metode pengujian yang menggunakan kertas cakram untuk memasukkan senyawa ke dalam media agar.
- f. Daya hambat *Streptococcus mutans* adalah kemampuan suatu bahan dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan dan reproduksi *Streptococcus mutans*. Aktivitas antibakteri dilihat dari daerah yang jernih atau transparan di sekitar bahan uji yang menandakan tidak terdapat pertumbuhan bakteri.

3.6. Instrumen Penelitian

Instrumen adalah segala peralatan yang digunakan untuk memperoleh, mengolah, dan menginterpretasikan informasi dari pada responden yang dilakukan pada pola pengukuran yang sama (Notoatmodjo, 2010).

- a. Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu, *rotary evaporator* (Bio Base), *autoclave* (Model YXQ.SG41.46.280AS), pipet ukur (pyrex), ose, mikropipet (Dragon Onemed), bunsen, neraca analitik (ACIS), jangka sorong, *laminar flow* (WINA Type 304), *incubator* (WINA Type 801), cawan (Normax), viskometer *ostwald*, dan peralatan gelas.
- b. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, ekstrak etanol biji kopi robusta sangrai, xylitol (Brataco), gliserin (Brataco), natrium benzoat, metil paraben, propil paraben, aquadest, etanol, cakram, bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Laboratorium *Pro Technology*, *Nutrien Agar* (Merch), *Nutrien Broth* (Merch), dan *Muller Hinton Agar* (Merch).

3.7. Prosedur Kerja

3.7.1. Determinasi Tanaman

Biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang akan digunakan dalam penelitian dilakukan determinasi terlebih dahulu di Laboratorium Universitas Setia Budi, Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Solo, untuk memastikan bahwa bagian tanaman yang akan digunakan sudah sesuai dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada kepustakaan.

3.7.2. Proses Ekstraksi

Biji kopi robusta sangrai diblender hingga menjadi serpihan kecil, selanjutnya ditumbuk sampai halus. Ditimbang sebanyak 200 g dan dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 mL selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Dipisahkan maserat dengan cara filtrasi. Diulangi proses penyarian sebanyak dua kali dengan jenis dan pelarut yang sama. Filtrat dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak kental biji kopi robusta sangrai (Utami *et al.*, 2018).

3.7.3. Identifikasi Senyawa Kimia Secara Kualitatif

Skrining fitokimia meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid.

a. Uji Alkaloid

Sebanyak 10 mg sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambah H₂SO₄ dan dikocok hingga homogen. Campuran disaring lalu masing-masing ditambahkan pereaksi *Mayer* dan *Dragendorff*. Hasil

positif yaitu terdapat endapan berwarna putih, coklat, dan jingga pada masing-masing pereaksi (Suhendar dan Fathurrahman, 2019).

b. Uji Flavonoid

Ekstrak etanol biji kopi robusta sangrai ditambah dengan beberapa tetes larutan soda api (NaOH). Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning terang dan berubah menjadi tidak berwarna jika ditambah dengan larutan asam encer (Kumoro, 2015).

c. Uji Tanin

Sebanyak 1 mL ekstrak etanol biji kopi robusta sangrai ditambahkan ke dalam 2 mL air suling di dalam tabung reaksi. Ditambah 3 tetes FeCl_3 1% ke dalam larutan ekstrak tersebut. Jika terbentuk warna biru-hijau, maka ekstrak tersebut mengandung tanin (*catechic tanin*), sedangkan jika terbentuk biru-hitam maka ekstrak tersebut mengandung tanin (*gallic tanin*) (Kumoro, 2015).

d. Uji Saponin

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,5 g, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 10 mL air panas lalu didinginkan, kemudian dikocok kuat selama 10 detik. Hasil positif apabila menghasilkan busa stabil dengan penambahan asam klorida (Utami *et al.*, 2018).

e. Uji Terpenoid

Sebanyak 10 mg sampel ditambahkan dengan kloroform, kemudian ditetesi dengan anhidrida asam asetat sebanyak 5 tetes. Larutan ditambah

dengan 3 tetes H_2SO_4 . Hasil positif jika larutan menjadi berwarna merah (Suhendar dan Fathurrahman, 2019).

3.7.4. Pembuatan Formula Obat Kumur

Formulasi obat kumur ekstrak etanol biji kopi robusta yang digunakan dalam penelitian ini dibuat dalam 3 formula dengan perbedaan konsentrasi gliserin pada masing-masing formula. Berikut bahan dan konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini:

Tabel 3.1 Formulasi Obat Kumur

Bahan	Fungsi	Formula 1 (%)	Formula 2 (%)	Formula 3 (%)
Ekstrak biji kopi robusta sangrai	Bahan Aktif Antibakteri	6	6	6
Xylitol	Pemanis	2	2	2
Gliserin	Humektan	5	10	15
Natrium Benzoat	Pengawet (Bakteriostatik)	0,1	0,1	0,1
Metil Paraben	Pengawet (Bakterisidal)	0,05	0,05	0,05
Propil Paraben	Pengawet (Bakterisidal)	0,01	0,01	0,01
Aquades	Pelarut	100 mL	100 mL	100 mL

(Gowtham *et al.*, 2020)

3.7.5. Evaluasi Sediaan Obat Kumur Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta

Evaluasi kestabilan dilakukan dengan mengukur beberapa parameter sebelum dan sesudah kondisi dipaksakan. Obat kumur disimpan pada suhu 5°C dan 35°C masing-masing selama 12 jam selama 10 siklus. Parameter yang diukur sebagai berikut:

a. Pengamatan Organoleptis

Sediaan obat kumur diamati selama 3 minggu penyimpanan meliputi warna, aroma, dan rasa (Handayani *et al.*, 2017).

b. Pengukuran pH

Setiap formula obat kumur diukur nilai pH-nya, menggunakan pH stik. Standar mutu obat kumur herbal yaitu pH antara 5-7 (Hidayanto *et al.*, 2017).

c. Pengukuran Viskositas

Pengukuran viskositas sediaan obat kumur ekstrak etanol biji kopi robusta sangrai menggunakan *Viskometer Ostwald* sebelum dan sesudah penyimpanan dipercepat (Handayani *et al.*, 2017).

3.7.6. Pembuatan Media Miring *Nutrien Agar* (NA) dan Inokulasi Bakteri *S. mutans*

Sebanyak 2,8 g NA dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 100 mL aquadest steril. Dipanaskan diatas kompor sampai homogen. Ditunggukap kemudian disterilkan selama 15 menit dalam *autoclave* dengan suhu 121°C. Dituangkan sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi steril. Media diletakkan dengan kemiringan yang diinginkan dan ditunggu hingga mengeras. Bakteri yang diperoleh dari Laboratorium *Pro Technology*, digoreskan rapat pada media agar miring secara zig-zag dari bawah sampai atas. Selanjutnya biakan diinkubasi pada suhu kamar (37°C) selama 24 jam (Mahmudah dan Atun, 2017).

3.7.7. Pembuatan Media Cair dan Suspensi *S. mutans*

Media cair dibuat dari *Nutrient broth* (NB). Menimbang NB sebanyak 3,25 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambahkan aquadest 250 mL. Media dipanaskan diatas kompor elektrik dan diaduk hingga mendidih dan homogen. Media yang telah homogen dituangkan ke dalam erlenmeyer 50

mL sebanyak 30 mL NB. Disterilkan dengan cara di *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C. Media didiamkan selama 24 jam.

Penanaman bakteri pada media cair dilakukan dengan mengambil satu koloni bakteri pada media agar miring yang telah ditumbuhkan sebelumnya menggunakan jarum ose steril, selanjutnya dimasukkan ke dalam media cair. Bakteri pada media cair kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Pertumbuhan *S. mutans* ditandai dengan adanya kekeruhan pada media (Mahmudah dan Atun, 2017).

3.7.8. Pembuatan Media Muller Hinton Agar (MHA)

Menimbang media MHA sebanyak 38 g, kemudian ditambahkan aquadest 1000 mL. Media MHA diaduk dan dipanaskan menggunakan *hot plate*. Dilakukan sterilisasi media MHA dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121° C. Kemudian media dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak 15 mL dan pengerjaan dilakukan di dalam LAF (Mahmudah dan Atun, 2017).

3.7.9. Tahap Pengujian Daya Hambat

Uji daya hambat bakteri *Streptococcus mutans* dinilai dengan menggunakan metode difusi agar. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 3 cawan kosong dan 15 cakram. Kertas cakram direndam selama 5 menit dalam masing-masing formula dan kontrol.

- a. Formula 1, obat kumur dengan konsentrasi gliserin 5%
- b. Formula 2, obat kumur dengan konsentrasi gliserin 10%
- c. Formula 3, obat kumur dengan konsentrasi gliserin 15%

- d. Kontrol (+), obat kumur Minosep® (Chlorhexidine)
- e. Kontrol (-), formula obat kumur yang tidak mengandung ekstrak biji kopi robusta sangrai.

Disetiap cawan petri yang telah berisi media MHA diinokulasikan 0,1 mL suspensi *Streptococcus mutans*, kemudian diletakkan 5 *paper blanc* dari 5 macam perlakuan. Dilakukan 3 kali repetisi. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Setelah 24 jam, cawan petri dikeluarkan dari *incubator* dan kemudian diukur zona bening atau zona inhibisi yang terlihat pada setiap cakram dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali oleh orang berbeda yang sebelumnya telah dilakukan penyamaan persepsi dan diambil rata-ratanya (Mahmudah dan Atun, 2017). Jika zona hambat berbentuk lonjong, maka pengukuran dilakukan pada diameter yang panjang (misal a mm) dan diameter yang pendek (misal b mm) kemudian keduanya dijumlah dan dibagi dua. Jadi diameter zona hambat (x) = $(a+b)/2$.

3.8. Analisis Data

Data penelitian yang diperoleh yaitu stabilitas fisik sediaan obat kumur dan daya hambat terhadap bakteri *S. mutans*. Data sifat fisik yang diperoleh yaitu organoleptis, pH, dan viskositas kemudian dianalisis secara deskriptif. Selanjutnya, data viskositas dianalisis secara statistik dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas penyebaran data. Jika data yang diperoleh tidak normal, maka digunakan uji *Wilcoxon*, sedangkan jika penyebaran data yang

diperoleh normal, maka dianalisis menggunakan uji T berpasangan (*Paired T Test*) untuk melihat signifikansi data sebelum dan sesudah kondisi dipaksakan.

Data daya hambat sediaan obat kumur terhadap bakteri *S. mutans* dilakukan uji statistik yaitu uji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan *Levene Test*. Apabila kedua uji menunjukkan data normal dan homogen ($p > 0,05$) maka dilakukan uji statistik parametrik yaitu *One Way Anova*. Tetapi jika datanya tidak terdistribusi normal dan/atau tidak homogen dilanjutkan dengan uji statistik nonparametrik yaitu *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney* (Efendi, 2017).