

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.) yang diambil dari kebun teh Kemuning, Kecamatan Ngargoyoso, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Januari 2019.

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang biasa digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah pucuk dan daun muda teh hijau (*Camellia sinensis* L.).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama adalah ekstrak daun teh hijau dalam sediaan obat kumur sebagai antibakteri *Streptococcus mutans*.

Variabel utama yang kedua adalah konsentrasi ekstrak daun teh hijau 1%, 2%, 3%, dan 4% sediaan obat kumur sebagai antibakteri *Streptococcus mutans*.

Variabel utama yang ketiga adalah daya hambat sediaan obat kumur daun teh hijau terhadap bakteri *Streptococcus mutans* secara *in vitro*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat dikelompokkan menjadi berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat diubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak daun teh hijau.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dapat dikendalikan atau dikontrol, variabel ini mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkontrol yang dimaksud dalam penelitian ini yaitu komposisi campuran obat kumur, metode pembuatan obat kumur, kondisi peralatan, bahan yang digunakan dalam laboratorium, dan kondisi percobaan laboratorium.

Variabel tergantung merupakan titik permasalahan dalam penelitian. Yang termasuk variabel tergantung pada penelitian ini yaitu kemampuan uji daya hambat bakteri dengan menggunakan ekstrak daun teh hijau, mutu fisik dari sediaan obat kumur tersebut diantaranya organoleptis, homogenitas, viskositas, dan pH obat kumur.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun teh hijau yang diambil pucuk dan daun teh hijau dari kebun teh Kemuning, Kecamatan Nargoyoso, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun teh hijau dibuat dengan menggunakan pucuk dan daun muda teh hijau yang diproses dengan tahapan pencucian, pengeringan, penggilingan, pengayakan dengan mesh 60.

Ketiga, ekstrak daun teh hijau adalah ekstrak dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan etanol 70%.

Keempat, formula obat kumur ekstrak daun teh hijau adalah formulasi ekstrak daun teh hijau yang dibuat dalam berbagai variasi konsentrasi 1%, 2%, 3%, dan 4%.

Kelima, uji mutu fisik pada sediaan obat kumur adalah pengujian yang dilakukan dengan uji organoleptis, uji homogenitas, uji viskositas, dan uji pH. Uji organoleptis adalah langkah awal untuk mengetahui bau, rasa, dan warna dengan menggunakan panca indera. Uji homogenitas adalah uji yang dilakukan dengan melihat larutan dilatar belakang hitam dan putih untuk melihat ketercampuran suatu partikel atau bahan didalam suatu sediaan. Uji viskositas adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kekentalan dari obat kumur, uji ini dilakukan dengan menggunakan pipa kapiler.

Uji pH adalah uji yang dilakukan dengan menggunakan pH meter untuk mengetahui pH obat kumur sesuai dengan rongga mulut manusia. Uji stabilitas, pada uji stabilitas digunakan untuk mengetahui sediaan obat kumur yang dibuat stabil dalam penyimpanan, sehingga pada penyimpanan yang cukup lama didalam ruang sediaan obat kumur tidak memisah.

Keenam, uji daya hambat adalah pengujian aktivitas daya hambat terhadap bakteri dengan metode difusi.

Ketujuh, obat kumur X adalah produk yang digunakan sebagai kontrol positif atau pembanding pada pengujian daerah hambat dengan metode difusi. Obat kumur X ini memiliki fungsi menghambat plak gigi, mencegah bau tidak sedap didalam rongga mulut, dan menghambat pertumbuhan bakteri didalam rongga mulut.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *autoclave*, batang pengaduk, cawan petri, erlenmeyer, *beaker glass*, gelas ukur, inkubator, blender, jangka sorong, jarum Ose, kertas indikator pH, pH meter, LAF (*Laminar Air Flow*), bunsen, mikropipet, *yellow tip*, oven, pinset, *rotavator*, timbangan analitik, botol maserasi, corong, pipet skala, sendok tanduk, spuit, *autovortex*, tabung reaksi steril, rak tabung, spidol, penggaris, *obyek glass*, lemari pendingin, dan botol vial.

2. Bahan

Bahan yang diperlukan daun teh hijau, biakan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175, cat kristal violet, etanol 70%, MHA (*Mueller Hinton Agar*), BHI (*Brain Heart Infusion*), metanol, H_2SO_4p , H_2SO_4 , kloroform, amoniak, Mayer, Wagner, $FeCl_3$, dietileter, Lieberman-Burchard, sorbitol, gliserol, metil paraben, propil paraben, aquadest, spiritus, cakram 8 mm, tisu, kertas label, kertas saring, aluminium foil, tween 80, *oleum menthae*.

D. Jalannya penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman merupakan tahap untuk menetapkan kebenaran sampel daun teh hijau yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.). Determinasi tanaman juga dapat bertujuan untuk menghindari kesalahan pemilihan bahan tanaman dalam penelitian. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

2. Sterilisasi bahan dan alat

Media agar merupakan bahan yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri yang harus disterilkan terlebih dahulu menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan oven pada suhu 150-180°C selama 1-2 jam, semua alat yang berasal dari kaca disterilkan dengan dibungkus koran agar saat dikeluarkan tetap steril. Alat lain yang digunakan seperti jarum Ose dan pinset cukup disterilkan dengan pemanasan di atas api bunsen. Sterilisasi inkas menggunakan alkohol 70% dan formalin (Suriawiria 1985).

3. Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk

Daun teh hijau yang diambil daun muda dan pucuk daunnya diperoleh dari kebun teh Kemuning, Kecamatan Ngargoyoso, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Daun teh hijau dikumpulkan kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, kemudian daun teh hijau ditimbang untuk memperoleh bobot hasil sebelum dioven, setelah itu dioven pada suhu 50°C, pengeringan dengan oven dipilih karena tidak tergantung pada cuaca dan suhu dapat diatur sesuai prosedur. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air suatu tanaman agar tidak mudah ditumbuhi kapang atau bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang dapat mengurangi zat aktif. Daun teh hijau yang sudah kering, diserbuk dengan alat penyerbuk, kemudian diayak dengan mesh 60.

4. Penetapan sifat fisika serbuk daun teh hijau

4.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis bertujuan untuk mengetahui bau, warna, dan rasa dalam sediaan serbuk daun teh hijau.

4.2 Penetapan susut pengeringan. Susut pengeringan diukur dengan menimbang 2 gram serbuk daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.) yang dikeringkan pada suhu 105°C selama 30 menit atau sampai dengan alat berbunyi, dimana alat tersebut menunjukkan bahwa pengukuran kadar air sudah dapat dilihat persentasenya. Alat yang digunakan dalam penetapan kadar air adalah moisture balance. Penetapan kadar air dilakukan 3 kali replikasi.

5. Pembuatan ekstrak daun teh hijau

Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.) dibuat dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi. Daun teh hijau terlebih dahulu disortir atau dipilah daun yang bagus, kemudian daun teh hijau yang sudah disortir dicuci pada air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel pada daun teh hijau. Daun teh hijau dikeringkan pada oven suhu yang konstan atau pada suhu 50°C. Daun teh hijau yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender untuk mendapatkan serbuk daun teh hijau. Berat serbuk daun teh hijau yang sudah didapat dimaserasi dengan menggunakan etanol 70%, kemudian digojok 6 jam pertama dilanjutkan penggojokan setelah 18 jam dan diendap tuangkan selama 5 hari. Hasil maserasi disaring menggunakan kain flanel dan diulang penyaringannya menggunakan kertas saring untuk mendapatkan maserat. Maserat yang didapat dipekatkan menggunakan alat *evaporator*, kemudian ekstrak hasil *evaporator* yang didapat dimasukkan dalam oven 50°C sampai kental dan mendapatkan bobot konstan. Hitung hasil rendemen dari ekstrak daun teh hijau.

6. Pemeriksaan uji bebas etanol ekstrak daun teh hijau

Pemeriksaan uji bebas etanol dalam ekstrak daun teh hijau dilakukan dengan menggunakan tabung reaksi. Ekstrak daun teh hijau ditambah dengan H₂SO₄ pekat kemudian ditambah lagi dengan CH₃COOH. Panaskan diatas api bunsen. Hasil uji negatif bila tercium bau khas eter (Kurniawati 2015).

7. Pemeriksaan fisik ekstrak daun teh hijau

7.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis bertujuan untuk mengetahui bau, warna, dan rasa dalam sediaan ekstrak daun teh hijau.

7.2 Penetapan susut pengeringan. Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam ekstrak daun teh hijau. Metode yang digunakan merupakan metode gravimetri dimana prinsip dari metode ini berdasarkan penguapan air yang ada dalam bahan dengan jalannya pemanasan, kemudian ditimbang sampai berat konstan. Pengurangan bobot yang terjadi merupakan kandungan air yang terdapat dalam bahan. Metode gravimetri dilakukan dengan memanaskan cawan kosong ke dalam oven selama 30 menit pada suhu 105°C, dinginkan cawan dalam eksikator selama 15 menit, kemudian

ditimbang (W_0). Timbang ekstrak daun teh hijau sebanyak 2 gram dimasukkan dalam cawan yang telah diketahui bobotnya, ditimbang (W_1). Ekstrak daun teh hijau yang telah ditimbang dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam, dinginkan dalam eksikator selama 15-30 menit, kemudian cawan berisi ekstrak daun teh hijau ditimbang dan dikeringkan kembali selama 1 jam. Dinginkan cawan berisi ekstrak daun teh hijau ke dalam eksikator, timbang kembali (W_2). Penetapan kadar air direplikasi 3 kali (Widya 2010). Kandungan air dihitung menggunakan rumus :

$$kadar\% = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W_1 : Ekstrak daun teh hijau awal (sebelum dioven)

W_2 : Ekstrak daun teh hijau (sesudah dioven)

8. Identifikasi kandungan senyawa daun teh hijau

8.1 Identifikasi fenol. Serbuk dan ekstrak daun teh hijau sebanyak 1 gram dipanaskan dalam 100 ml air suling dan dididihkan selama 15 menit, kemudian disaring dan diperoleh filtrat. Filtrat sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan besi (III) klorida. Hasil positif fenolik ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau, violet, biru sampai hitam (Depkes RI 1979).

8.2 Identifikasi flavonoid. Serbuk dan ekstrak daun teh hijau ditimbang sebanyak 0,1 gram ditambahkan 5 ml metanol, kemudian dipanaskan pada suhu 50°C . Filtrat dipisahkan dan ditambahkan H_2SO_4 pekat. Penambahan H_2SO_4 pekat akan mengakibatkan terbentuknya warna merah atau kuning yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Depkes RI 1979).

8.3 Identifikasi saponin. Serbuk dan ekstrak daun teh hijau ditimbang sebanyak 0,05 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah 10 ml air panas, kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik. Saponin positif apabila terbentuk buih setinggi 1 sampai 10 cm, dan pada penambahan 1 tetes asam klorida klorida 2 N, buih tidak hilang (Depkes RI 1979).

8.4 Identifikasi tanin. Serbuk dan ekstrak daun teh hijau ditimbang sebanyak 0,05 gram ditambah air sebanyak 10 ml air panas. Larutan tersebut

ditambah dengan 1 tetes FeCl_3 . Tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman (Depkes RI 1979).

8.5 Identifikasi triterpenoid dan steroid. Serbuk dan ekstrak daun teh hijau ditimbang sebanyak 0,1 gram dimasukkan cawan penguap, ditambah 5 ml etanol 70%, kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit. Disaring panas-panas, filtrat diuapkan dalam penangas air sampai kering. Filtrat yang kering ditambahkan CHCl_3 hingga larut, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan air hingga membentuk 2 lapisan CHCl_3 dan air. Diambil lapisan CHCl_3 kemudian dikeringkan di dalam plat tetes, ditambah pereaksi Lieberman-Burchard (3 tetes asam asetat anhidrat dan ditambahkan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat). Steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau hijau, sedangkan terpen positif apabila terbentuk warna merah atau ungu (Depkes RI 1979).

8.6 Identifikasi alkaloid. Serbuk dan ekstrak daun teh hijau sebanyak 0,1 gram dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 5 ml kloroform dan 5 tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan kemudian ditambahkan H_2SO_4 2 N sebanyak 1,5 ml. Fraksi H_2SO_4 diambil kemudian dibagi dalam tiga tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan pereaksi Dragendroff, tabung kedua ditambahkan pereaksi Meyer, dan tabung ketiga ditambahkan pereaksi Wagner. Alkaloid yang terbentuk karena penambahan pereaksi Dragendroff akan menunjukkan endapan merah, pada penambahan pereaksi Meyer akan menunjukkan terjadinya endapan putih, dan pada penambahan pereaksi Wagner akan terbentuk endapan coklat (Depkes RI 1986).

9. Formulasi obat kumur daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.)

Tabel 2. Optimasi formula obat kumur daun teh hijau (Pedrazzi et al 2014)

Nama Zat	Jumlah zat dalam formula (% b/v)				
	K-	F1	F2	F3	F4
Ekstrak daun teh hijau	-	1	2	3	4
Sorbitol	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
Gliserol	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Tween 80	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4
Propil paraben	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Metil paraben	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
<i>Oleum menthae</i>	20 tetes	20 tetes	20 tetes	20 tetes	20 tetes
Aquadest	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml

10. Cara pembuatan obat kumur

Daun teh hijau akan dibuat dalam sediaan obat kumur dengan berbagai macam variasi konsentrasi ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.). Pembuatan obat kumur dari ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.) dilakukan dengan menimbang ekstrak sebanyak 1 gram, 2 gram, 3 gram, dan 4 gram. Timbang tween 80 dan aquadest dengan perbandingan 1:5, panaskan diatas *waterbath* (penangas air) sampai tween 80 larut sempurna dalam aquadest. Diamkan campuran tween 80 dan aquadest sampai hangat atau sekitar suhu 25-30°C. Ekstrak daun teh hijau masing-masing konsentrasi ditetesi dengan *oleum menthae* sebanyak 20 tetes aduk sampai larut. Tuang sedikit demi sedikit campuran tween 80 dan aquadest ke dalam ekstrak daun teh hijau yang sudah dilarutkan dengan *oleum menthae*, aduk sampai semuanya larut dan homogen.

Menimbang gliserol sebanyak 1,8 gram masukkan *beakerglass*, timbang sorbitol sebanyak 4,2 gram masukkan ke dalam *beakerglass* berisi gliserol, aduk sampai homogen. Timbang metil paraben masukkan ke dalam fase air yaitu campuran gliserol dan sorbitol aduk sampai larut. Timbang propil paraben masukkan ke dalam fase minyak yaitu campuran ekstrak daun teh hijau, tween 80, dan *oleum menthae*, aduk sampai larut. Campurkan fase air ke dalam fase minyak sedikit demi sedikit sambil aduk terus sampai homogen. Hasil dimasukkan dalam botol yang sudah dikalbrasi tambahkan aquadest hingga mencapai tanda batas. Langkah pembuatan obat kumur dilakukan sebanyak 5 kali untuk 4 formula berisi ekstrak dan 1 formula sebagai kontrol (-) negatif.

11. Uji mutu fisik dan stabilitas obat kumur

11.1 Uji organoleptis. Pengujian organoleptis sediaan obat kumur meliputi pemeriksaan bentuk, warna, dan kejernihan obat kumur ekstrak daun teh hijau yang dibuat. Pengujian organoleptis dilakukan secara visual. Obat kumur yang dibuat agar mampu menghambat pertumbuhan bakteri didalam rongga mulut (Elmitra 2017).

11.2 Uji homogenitas. Uji homogenitas obat kumur dilihat dibawah cahaya yang sangat terang untuk memastikan semua zat didalam obat kumur terlarut secara sempurna dan tidak ada partikel yang mengendap dibawah (Elmitra 2017).

11.3 Uji pH. Uji pH pada sediaan obat kumur dengan menggunakan alat pH meter. Sebelum digunakan alat dikalibrasi menggunakan larutan dapar pH 7 dan pH 4. Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam obat kumur, jarum pada pH meter dibiarkan bergerak sampai menunjukkan posisi tetap, nilai pH yang ditunjukkan pada jarum dicatat. Sediaan obat kumur yang baik memiliki pH 5-7 (Elmitra 2017).

11.4 Uji viskositas. Pengujian viskositas obat kumur dilakukan dengan berbagai macam metode. Pertama menggunakan metode Cup & Bob. Sampel obat kumur yang akan diuji dimasukkan ke dalam cup sampai alat bobnya terendam sediaan obat kumur, kemudian tempatkan rotor tepat di tengah-tengah cup yang telah terisi sampel. Viskometer dinyalakan kurang lebih 10 detik atau sampai jarum konstan. Viskositas dibaca pada skala dari rotor yang digunakan, setelah pengukuran viskositas, viskometer dimatikan, lakukan pengujian sebanyak tiga kali tiap formula (Elmitra 2017).

Kedua dengan menggunakan metode kapiler. Tegangan permukaan di ukur dengan melihat ketinggian air/cairan yang naik melalui suatu kapiler. Bila suatu pipa kapiler di masukkan ke dalam cairan yang membasahi dinding maka cairan akan naik ke dalam kapiler karena adanya tegangan muka. Kenaikan cairan sampai pada suhu tinggi tertentu sehingga terjadi keseimbangan antara gaya ke atas dan ke bawah. Metode kenaikan kapiler hanya dapat digunakan untuk mengukur tegangan permukaan tidak bisa untuk mengukur tegangan antar muka (Elmitra 2017).

11.5 Uji stabilitas. Uji stabilitas bertujuan untuk melihat terjadinya pemisahan dalam sediaan selama proses penyimpanan. Uji stabilitas dilakukan dengan menggunakan metode ruang, pada uji ini dilakukan dengan cara mengamati larutan obat kumur ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.) didalam suhu ruang atau kamar. Suhu ruang yang biasa digunakan yaitu 25°C dilakukan selama 1 bulan, kemudian diamati adanya perubahan organoleptis dari obat kumur ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.) tersebut (Elmitra 2017).

12. Identifikasi bakteri *Streptococcus mutans*

12.1 Identifikasi dengan pewarnaan gram. Identifikasi bakteri dilakukan dengan cara pengamatan gram terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dimana akan dilakukan pengecatan bakteri yang merupakan pengecatan diferensial yang bertujuan untuk memberi warna pada bakteri agar terlihat jelas dan untuk mengetahui antara gram positif dan gram negatif. Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 merupakan gram positif dengan menunjukkan bentuk bakteri bulat, rantai, dan berwarna ungu. Pada bakteri gram positif dinding selnya terdiri dari lapisan peptidoglikan yang tebal sehingga permeabilitas dinding sel bakteri kurang, maka kompleks ungu kristal iodine dipertahankan dan bakteri tetap berwarna ungu (Jawetz *et al.* 2007).

Cara pengecatan atau perwarnaan bakteri *Streptococcus mutans* ini dilakukan dengan menyiapkan Ose, bakteri, objek glass, dan bahan-bahan lainnya. Ose terlebih dahulu disterilkan menggunakan api bunsen sampai membara merah, angin-anginkan sebentar dekat api agar tetap aseptis. Bakteri diambil menggunakan Ose kemudian diratakan pada permukaan objek glass yang sudah dibersihkan dengan alkohol 70%. Bakteri yang berada pada permukaan objek glass ditetesi dengan menggunakan aquadest, kemudian lewat-lewatkan diatas api sampai kering. Tetesi dengan gram A (cairan kristal violet diamkan selama 1 menit, bilas dengan lembut pada air mengalir. Tetesi dengan gram B (larutan yodium) diamkan selama 1 menit, bilas dengan lembut menggunakan air mengalir. Tahapan selanjutnya tetesi dengan gram C (alkohol 70%) diamkan selama 30 detik, kemudian ditambahkan larutan gram D (larutan safranin), keringkan sekitar bakteri yang diwarnai. Lakukan pengamatan pada mikroskop, sebelumnya objek glass berisi bakteri yang telah diwarnai ditetesi dengan menggunakan larutan imersi. Penggunaan larutan imersi ini bertujuan agar bakteri yang akan diamati terlihat lebih jelas dan menghindari terjadinya indeks bias. Pengamatan dilihat pada mikroskop perbesaran 100x (Jawetz *et al.* 2007).

12.2 Identifikasi dengan uji biokimia. Identifikasi dengan uji biokimia dilakukan dengan menyiapkan 2 tabung reaksi yang masing-masing berisi suspensi bakteri *Streptococcus mutans*. Tabung pertama ditambahkan dengan

H₂O₂ (hidrogen peroksida), pada identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* diperoleh hasil negatif, dimana tidak terdapat gelembung pada bakteri ini. Hal ini menunjukkan identifikasi pada bakteri tersebut benar-benar bakteri *Streptococcus mutans*. Tabung kedua ditambahkan plasma sitrat, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil yang didapat pada uji ini terdapat plasma yang menggumpal, dimana identifikasi uji biokimia ini menunjukkan adanya bakteri *Streptococcus mutans* (Jawetz *et al.* 2007).

12.3 Identifikasi dengan agar darah. Identifikasi pada media Agar Darah dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan terbukti dan benar-benar bakteri *Streptococcus mutans*. Suspensi bakteri digoreskan diatas permukaan media dengan menggunakan kapas lidi steril. Media yang digunakan yaitu media MHA (*Mueller Hinton Agar*). Bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji bakteri *Streptococcus mutans* pada media agar darah menunjukkan hemolisis pada sel darah merah sehingga bakteri *Streptococcus mutans* mempunyai tipe α -hemolitik yaitu melisis sel darah merah secara parsial akibat reduksi hemoglobin, maka disekitar koloni bakteri akan menunjukkan warna kehijauan (Jawetz *et al.* 2007).

13. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*

Bakteri induk yang sudah diperoleh dikultur pada media Nutrien Agar darah diambil 1-2 koloni bakteri dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi larutan BHI. Suspensi bakteri dihomogenkan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2 jam dalam *shaker* inkubator. Suspensi bakteri yang digunakan untuk pengujian konsentrasinya disamakan standar Mc Farland 10⁸ CFU/ml, jika konsentrasi melebihi standar Mc Farland 1,5 x 10⁸ CFU/ml, maka ditambahkan BHI (*Brain Heart Infusion*) sampai sama dengan standar Mc Farland.

14. Metode uji difusi bakteri *Streptococcus mutans*

Metode pengujian yang digunakan adalah metode difusi dengan cakram kertas yang digunakan untuk menguji biakan bakteri *Streptococcus mutans*.

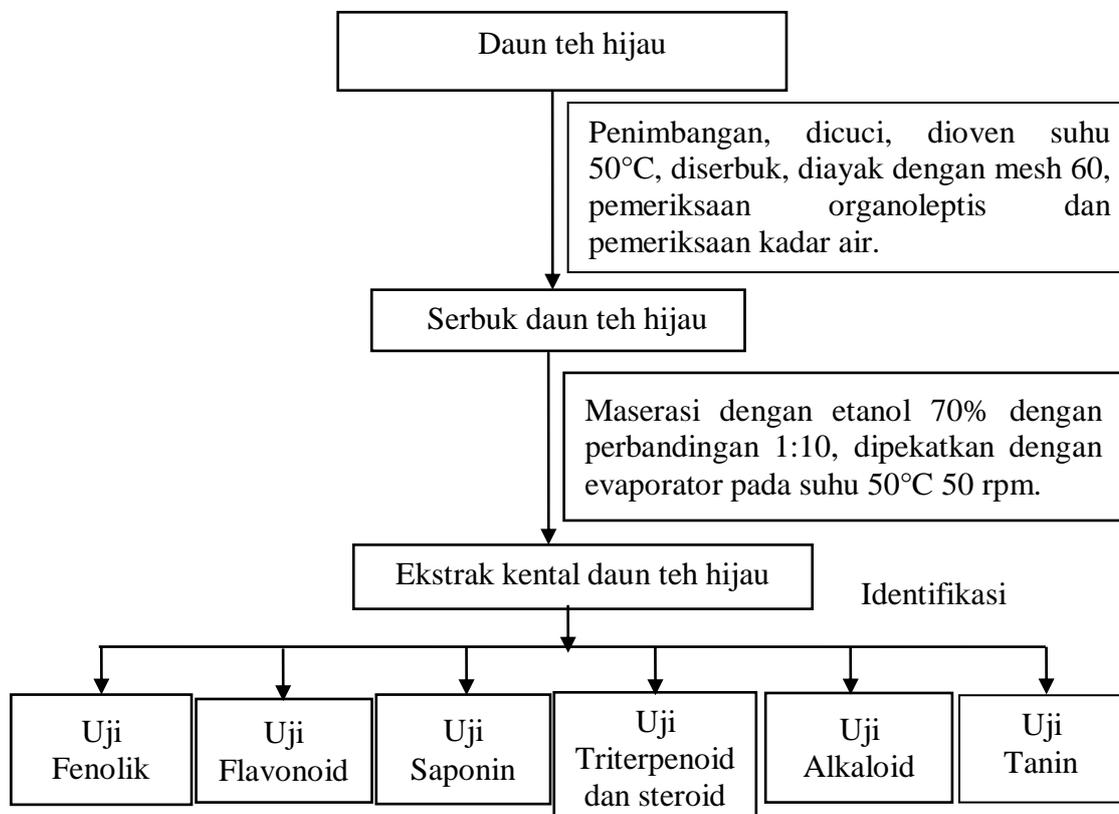
Metode ini dilakukan dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat kemudian diinokulasikan ke dalam media agar darah dengan metode perataan (*Spread Plate Method*). Media didiamkan 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Pada media agar darah diletakkan 6 cakram masing-masing berukuran ± 8 mm yang ditetesi menggunakan mikropipet sebanyak 50 μ L sediaan obat kumur dengan berbagai variasi konsentrasi ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.).

Cakram yang digunakan untuk konsentrasi ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.) yaitu 4 cakram ditetesi dengan variasi konsentrasi masing-masing, yaitu 1%, 2%, 3%, 4% sebagai sampel uji. 2 cakram digunakan untuk kontrol negatif adalah formula obat kumur tanpa ekstrak daun teh hijau dan kontrol positif yang digunakan adalah larutan obat kumur X, masing-masing dengan volume 50 μ L. Masa inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi selesai, daerah bening di sekitar cakram kertas diamati dan diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong 4 sisi. Satuan yang digunakan untuk mengukur daerah hambat dinyatakan dalam satuan mm. Pengujian daya hambat ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk setiap konsentrasi yang diuji (Ditjen POM 1995).

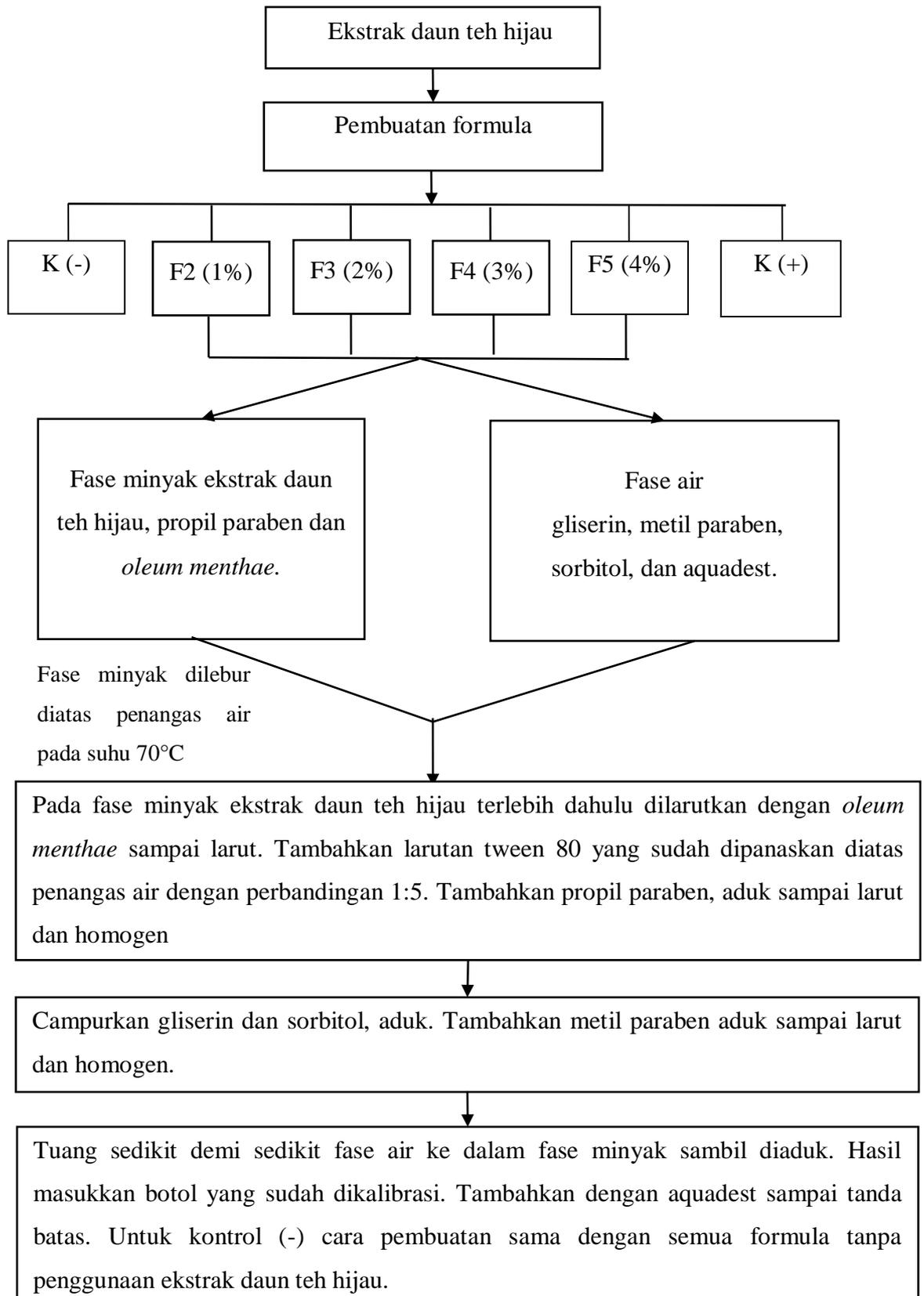
E. Analisis Hasil

Analisis hasil pengujian dari berbagai parameter yaitu pH, viskositas, dan uji difusi dianalisis dengan membandingkan hasil yang diperoleh dengan beberapa literatur yang sudah didapat dan dianalisis menggunakan SPSS. Data dari hasil pengujian dianalisis dengan *One-Sample Kolmogorov Smirnov Test*, bila hasil yang diperoleh terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan analisis *One Way Anova* pada taraf kepercayaan 95%, kemudian dilanjutkan dengan *Tukey HSD* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan dan homogenitas data.

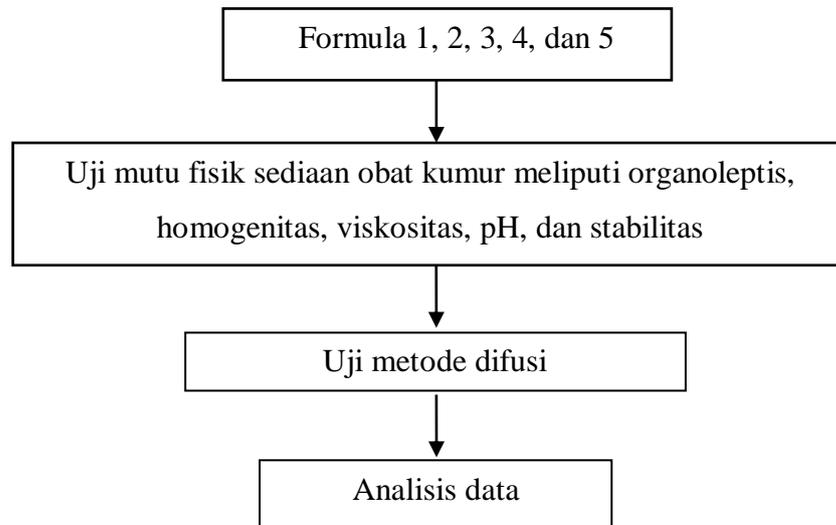
F. Skema Jalannya Penelitian



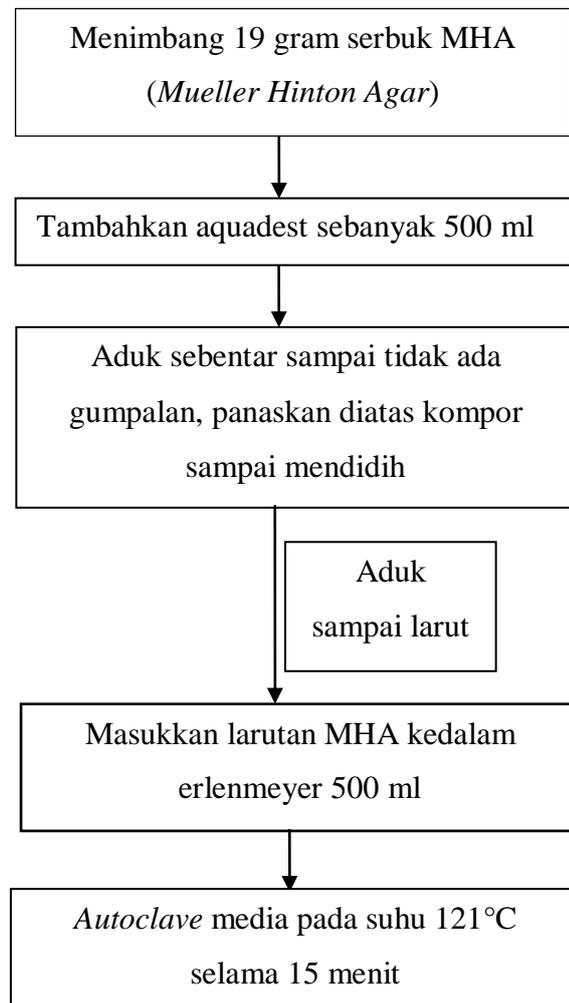
Gambar 11. Skema pembuatan ekstrak daun teh hijau dan identifikasi kandungan.



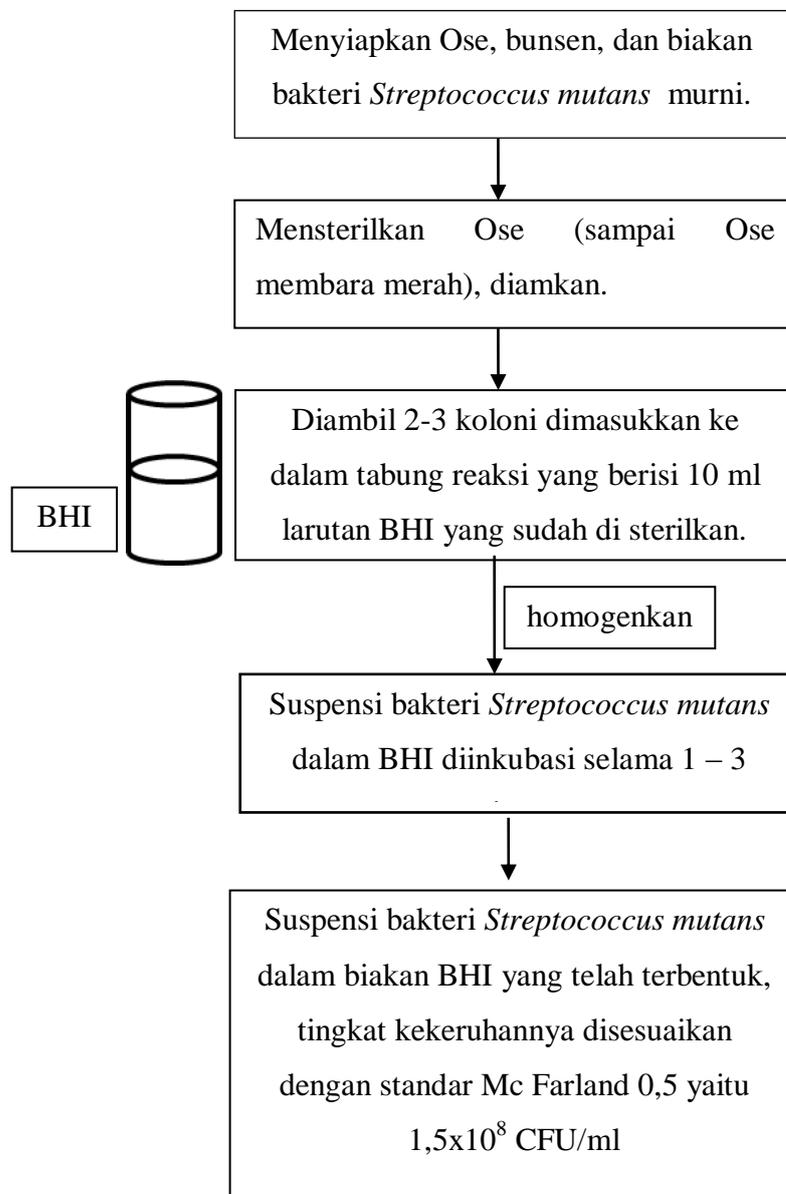
Gambar 12. Skema pembuatan formula.



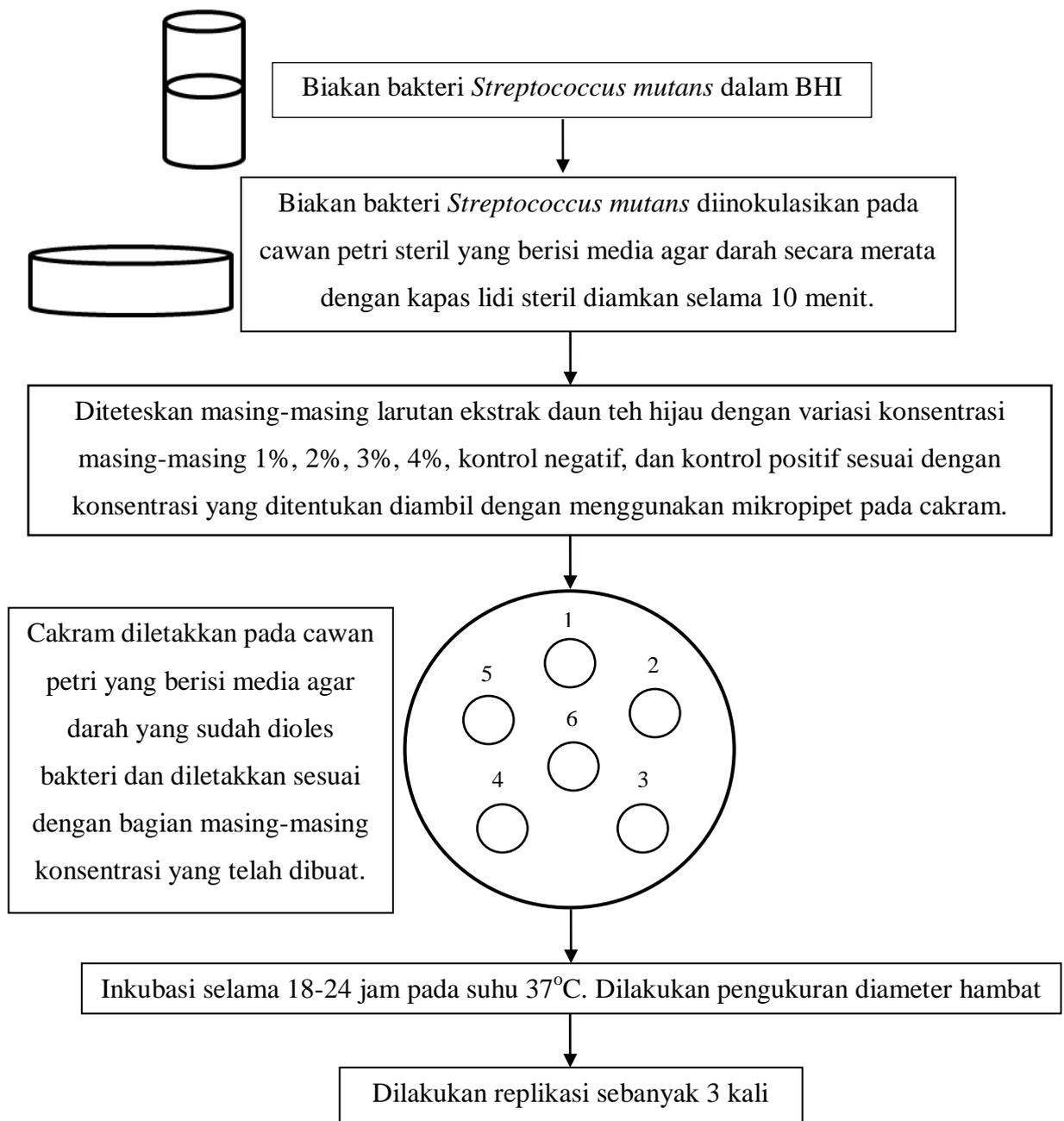
Gambar 13. Skema pengujian obat kumur.



Gambar 14. Skema pembuatan media MHA



Gambar 15. Skema pembuatan suspensi bakteri *S. mutans* ATCC 25175



Keterangan:

(1) Kontrol negatif larutan obat kumur tanpa ekstrak, (2) Ekstrak daun teh hijau 1%, (3) Ekstrak daun teh hijau 2%, (4) Ekstrak daun teh hijau 3%, (5) Ekstrak daun teh hijau 4%, (6) Kontrol positif larutan obat kumur X.

Gambar 16. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi