

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman siwak (*Salvadora persica*) yang beredar di Jakarta pada bulan Januari 2019.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.) yang diambil secara acak yang beredar di Jakarta pada bulan Januari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dari penelitian ini adalah yang pertama, ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.).

Variabel utama yang kedua adalah, formulasi obat kumur ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.).

Variabel utama yang ketiga adalah, uji aktivitas daya hambat obat kumur ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 secara *in vitro*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang bisa diubah-ubah dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi dari obat kumur ekstrak kayu siwak.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali

dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175, kondisi laboratorium (meliputi kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, dan metode ekstraksi.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat dari obat kumur ekstrak kayu siwak terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 di media uji.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, kayu siwak adalah batang dari tanaman siwak yang beredar di Kota Jakarta, Jawa Barat pada bulan Januari 2019.

Kedua, serbuk kayu siwak adalah kayu siwak yang sudah dikupas kulit luarnya, dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil, dan dikeringkan, selanjutnya dilakukan pembuatan serbuk menggunakan mesin *Disk Mill*, serbuk kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak kayu siwak adalah hasil ekstraksi dari serbuk kayu siwak dengan larutan penyari etanol 70% menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1 : 10.

Keempat, formula obat kumur ekstrak kayu siwak adalah formulasi obat kumur yang dibuat dari ekstrak kayu siwak dengan seri konsentrasi 0% (kontrol), 1%, 3%, 5%, dan 7% dengan bahan pembawa sorbitol, gliserin, tween 80, propil paraben, metil paraben, *oleum menthae*, dan *aquadestilata*.

Kelima, bakteri uji dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang diambil dari Laboratorium Biologi UGM, Yogyakarta.

Keenam, uji aktivitas antibakteri adalah uji aktivitas secara difusi menggunakan metode cakram dengan konsentrasi 1%, 3%, 5%, dan 7%, pengukuran aktivitas antibakteri dengan melihat diameter zona hambat. Diameter zona hambat adalah zona bening yang terbentuk di sekitar cakram. Pertumbuhan bakteri dalam media uji, kontrol positif menggunakan produk obat kumur "X", dan kontrol negatif menggunakan formula obat kumur tanpa penambahan ekstrak.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah cawan petri steril, tabung reaksi steril, kapas lidi steril, rak tabung reaksi, *disk mill*, blender, gunting tanaman, *moisture balance*, oven, pH meter, pignometer, erlenmeyer, penjepit, pipet volume, gelas ukur, *obyek glass*, *deg glass*, mikroskop, ayakan no. 40, kain flanel, inkubator, mikropipet, *autovortex*, autoklaf, pinset, neraca analitik, bejana maserasi, waterbath, *vacum rotary evaporator*, jarum Ose, spidol, penggaris dan kertas cakram yang disterilisasi dalam oven dengan suhu 121°C selama 30 menit.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu siwak, etanol 70%, *aquadestilata*, standar Mc Farland 0,5, pereaksi *Lieberman – Bourchard*, pereaksi mayer, pereaksi dragendorf, HCL 2N, kloroform, asam sulfat, asam asetat anhidrat, serbuk Mg, sorbitol, gliserin, tween 80, metil paraben, propil paraben, dan *Oleum menthae*, bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Blood Agar Plate* (BAP), dan *Brain Heart Infusion* (BHI).

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi tanaman

Tahapan pertama pada penelitian ini adalah identifikasi tanaman yang dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman siwak (*Salvadora persica* Linn.) sesuai kepustakaan dan dibuktikan di bagian Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pembuatan serbuk simplisia

Sebanyak 700 g kayu siwak yang telah dikupas kulit luarnya, dicuci, dipotong menjadi bagian-bagian kecil, lalu dikeringkan menggunakan oven suhu 50°C selama 2 hari. Masuk ke tahap pembuatan serbuk dengan menggunakan mesin *Disk Mill*, setelah diperoleh serbuk dihaluskan lagi dengan blender, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40. Pembuatan serbuk bertujuan agar luas

partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sampai penyarian berlangsung secara efektif.

3. Pembuatan ekstrak

Ekstraksi diawali dengan diperoleh sebanyak 250 g serbuk kayu siwak, selanjutnya dilakukan perendaman terhadap serbuk kayu siwak menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1 : 10 selama 48 jam. Tahap selanjutnya dilakukan filtrasi, ampas dilakukan pengulangan dengan pelarut sebanyak setengah dari volume awal, setelah itu hasil filtrasi dilakukan evaporasi menggunakan alat *vacum rotary evaporator* dengan suhu sebesar 50°C dan kecepatan 75 rpm dan diuapkan dengan *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental kayu siwak (Apriansi 2017).

4. Perhitungan rendemen

Menurut Rasyadi (2018), perhitungan rendemen bertujuan untuk membandingkan berat ekstrak kental yang didapat dengan berat kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.) awal. Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat serbuk}} \times 100\%$$

5. Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak

Penetapan susut pengeringan serbuk kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.) dilakukan dengan menggunakan alat *Moisture balance*. Penggunaan alat *Moisture balance* diawali dengan menyalakan alat, lalu ditunggu suhunya stabil selama 5 menit, lalu menimbang serbuk kayu siwak sebanyak 2 g, ditutup dan ditekan tombolnya, tunggu sampai alat berbunyi yang menandakan bobot serbuk sudah konstan, pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

Penetapan susut pengeringan ekstrak kayu siwak dilakukan dengan metode gravimetri. Penetapan diawali dengan menimbang cawan kosong, lalu menimbang ekstrak sebanyak 2 g, selanjutnya ekstrak dimasukkan ke dalam oven selama 1-2 jam lalu dimasukkan ke dalam eksikator selama 15 menit, kemudian kembali ditimbang, dilakukan hingga berat ekstrak konstan. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

6. Pemeriksaan fisik serbuk dan ekstrak

Pemeriksaan fisik ekstrak meliputi uji organoleptis serbuk dan ekstrak. Uji organoleptis dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui bentuk, bau, rasa, dan warna dari serbuk dan ekstrak serta sebagai kontrol kualitas. Uji organoleptis ekstrak meliputi pemeriksaan bentuk, bau, warna, dan rasa dari serbuk dan juga ekstrak.

7. Uji bebas etanol

Ekstrak yang telah dipisahkan diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yakni ekstrak ditambahkan dengan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, hasil positif ditandai dengan tidak terbentuknya bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 2006). Uji bebas etanol bertujuan supaya pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri.

8. Identifikasi kandungan senyawa kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan dengan tujuan untuk memastikan atau menjamin kebenaran kandungan senyawa kimia yang ada pada kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.) diantaranya ada terpenoid, alkaloid, dan flavonoid.

8.1 Terpenoid. Sejumlah 0,1 gram sampel ditempatkan pada plat tetes, lalu ditambahkan 0,5 ml kloroform, ditambahkan 0,5 ml asetat anhidrat, ditetesi dengan H_2SO_4 , lalu ditambahkan pereaksi Lieberman – Bouchard setelah itu diamati perubahan warnanya. Hasil positif mengandung terpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau violet (Ngajow *et al.* 2013).

8.2 Alkaloid. Menyiapkan 2 tabung, masing-masing dimasukkan sebanyak 0,1 gram sampel ditambahkan 1 ml HCL 2N dan 6 ml *aquadestilata*, kemudian dipanaskan selama ± 2 menit, lalu didinginkan. Selanjutnya ditambahkan sebanyak 2 – 4 tetes pereaksi mayer pada tabung pertama dan 2 – 4 tetes pereaksi dragendorf pada tabung kedua. Diamati perubahan yang terjadi. Hasil positif ditandai dengan adanya endapan putih kekuningan pada tabung dengan pereaksi mayer, dan endapan coklat kemerahan pada tabung dengan pereaksi dragendorf (Ernawati & Kumala Sari 2015).

8.3 Flavonoid. Sebanyak 0,1 gram sampel, dilarutkan dengan 5 ml air, dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dipanaskan selama ± 5 menit. Selanjutnya ditambahkan serbuk Mg secukupnya, kemudian ditambahkan sebanyak 1 ml HCL pekat, dan 2 ml etanol, lalu diamati warna yang terbentuk. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga (Ngajow *et al.* 2013).

9. Sterilisasi alat

Semua alat yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat seperti tabung reaksi, gelas ukur, dan erlenmeyer ditutup dengan kapas. Cawan Petri dibungkus dengan kertas, semuanya dimasukkan menjadi satu kedalam kertas dan disterilkan dengan oven pada suhu 160°C selama 1 jam. Jarum Ose disterilkan dengan cara dibakar pada nyala api bunsen hingga membara. Semua media pembedihan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pemilihan metode sterilisasi didasarkan pada sifat bahan yang akan disterilkan. Alat-alat gelas disterilkan dengan oven karena berbahan kaca yang tahan akan pemanasan dengan suhu tinggi dan waktu yang lebih lama, selain itu uap tidak dapat berpenetrasi dengan mudah pada alat-alat berbahan kaca, sehingga dipilih metode sterilisasi dengan oven. Media pembedihan disterilisasikan dengan menggunakan autoklaf karena uap panas dapat berpenetrasi ke dalam media dan membunuh bakteri sehingga media menjadi steril.

10. Formulasi obat kumur ekstrak kayu siwak

Tabel 1. Formula obat kumur ekstrak kayu siwak

Nama zat	Jumlah zat dalam formula (%b/v)				
	K-	F1	F2	F3	F4
Ekstrak kayu siwak	0	1	3	5	7
Sorbitol	5	5	5	5	5
Gliserin	3	3	3	3	3
Tween 80	5	5	5	5	5
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>	18 tetes	18 tetes	18 tetes	18 tetes	18 tetes
<i>Aquadestilata</i>	Ad 100ml	Ad 100ml	Ad 100ml	Ad 100ml	Ad 100ml

11. Pembuatan obat kumur

Semua bahan dipersiapkan, dimulai dengan mengencerkan tween 80 menggunakan beaker glas, tween 80 diencerkan dalam *aquadestilata* perbandingan 1 : 5 pengenceran dilakukan di atas *waterbath*. Selanjutnya dalam cawan porselin melarutkan ekstrak kental dengan *oleum menthae* sampai ekstrak larut ditandai dengan ekstrak menjadi lebih cair. Lalu mencampurkan tween yang telah diencerkan ke dalam campuran ekstrak sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai larut, dan ditambahkan propil paraben sedikit demi sedikit sambil terus diaduk hingga terlarut sempurna (Campuran 1).

Selanjutnya dalam beaker glas mencampurkan sorbitol dan gliserin, diaduk sampai larut, lalu ditambahkan metil paraben sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga terlarut sempurna (Campuran 2).

Kemudian campuran 2 dimasukkan ke dalam campuran 1 sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga homogen. Selanjutnya campuran obat kumur dimasukkan ke dalam botol yang sudah dikalibrasi terlebih dahulu sebelumnya, dan ditambahkan *aquadestilata* hingga tanda batas, lalu digoyangkan sehingga obat kumur homogen.

12. Pengujian mutu fisik dan stabilitas obat kumur

12.1 Uji organoleptis obat kumur. Obat kumur ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.) diuji organoleptis formula dengan cara obat kumur yang sudah dibuat dituangkan ke dalam wadah yang bening, lalu diamati bau, rasa, warna, dan kejernihan atau homogenitas, serta ada atau tidaknya endapan pada sediaan uji. Pengamatan dilakukan selama 21 hari.

12.2 Uji pH obat kumur. Obat kumur ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.) diuji pH formula menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi dengan larutan *buffer* standar dan pH 7. Pengujian pH dilakukan dengan mencelupkan pH meter yang telah dikalibrasi ke dalam larutan uji obat kumur ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.) lalu dicatat angka yang muncul pada layar. Pengujian dilakukan selama 21 hari. Hasil pengujian dilakukan uji statistik menggunakan program SPSS 21.0 dengan metode *Kolmogorov-Smirnov*. Jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji statistik *Paired*

Samples T-Test. Tujuan dilakukannya uji *Paired samples T-Test* adalah untuk mengetahui apakah terjadi perubahan pH selama penyimpanan.

12.3 Uji viskositas obat kumur. Obat kumur ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.) diuji viskositas menggunakan alat viscometer Oswald. Sampel sediaan uji diukur waktu alirnya, lalu ditimbang menggunakan pignometer untuk mengetahui bobot jenisnya, pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Data pengujian dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\eta \text{ sampel} = \frac{\rho \text{ sampel} \times t \text{ sampel}}{\rho \text{ aquadest} \times t \text{ aquadest}} \times \eta \text{ aquadest}$$

*Keterangan :

η sampel: viskositas sampel	ρ aquadest : bobot jenis aquadest
η aquadest : viskositas aquadest	t sampel : waktu alir sampel
ρ sampel : bobot jenis sampel	t aquadest : waktu alir aquadest

Pengujian dilakukan pada hari ke 1 dan hari ke 21. Hasil pengujian dilakukan uji statistik menggunakan program SPSS 21.0 dengan metode *Kolmogorov-Smirnov*. Jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka dilanjutkan dengan analisis *Paired Samples T-Test*. Tujuan dilakukannya uji *Paired Samples T-Test* adalah untuk mengetahui apakah terjadi perubahan viskositas selama penyimpanan.

13. Pembuatan media MHA

Pembuatan media MHA dilakukan dengan menimbang serbuk MHA sebanyak 19 g, selanjutnya dimasukkan ke dalam panci ditambahkan 500 ml *aquadestilata*, diaduk supaya tidak menggumpal dan menyalakan api, kembali diaduk hingga terlarut sempurna dan mendidih. Media yang telah mendidih diangkat dan ditunggu sebentar hingga tidak terlalu panas, kemudian dituangkan ke dalam erlenmeyer, ditutup dengan kapas dan kertas diberi nama. Media disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

14. Pembuatan media BHI

Pembuatan media BHI dilakukan dengan menimbang serbuk BHI sebanyak 1,8 g, selanjutnya dimasukkan ke dalam panci ditambahkan 50 ml *aquadestilata*, diaduk supaya tidak menggumpal dan menyalakan api, kembali

diaduk hingga terlarut sempurna dan mendidih. Media yang telah mendidih diangkat dan ditunggu sebentar hingga tidak terlalu panas, kemudian dituangkan ke dalam 5 tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml, ditutup dengan kapas dan kertas diberi nama. Media disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

15. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Pembuatan suspensi bertujuan untuk menentukan jumlah bakteri dan dibandingkan dengan standar Mc Farland 0,5. Pembuatan suspensi dilakukan dengan cara diambil koloni dari biakan murni kurang lebih 2-3 Ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media BHI 10 ml lalu dihomogenkan dan dilakukan inkubasi selama 5-8 jam. Amati kekeruhan dan bandingkan dengan standar Mc Farland 0,5.

Apabila didapat hasil lebih keruh dari standar Mc Farland 0,5 maka tambahkan media BHI secukupnya hingga sama dengan standar, namun apabila lebih jernih dari standar maka lakukan inkubasi lagi 1-3 jam untuk mengamati apakah kekeruhannya bertambah, atau bisa juga ditambahkan lagi beberapa Ose bakteri dari koloni pada media selektif lalu diinkubasi selama 1-3 jam. Amati kekeruhan hingga mencapai standar Mc Farland 0,5. Bakteri yang berada dalam media BHI yang sudah sesuai kekeruhannya dengan standar Mc Farland 0,5 merupakan larutan stok bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

16. Identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Pertama, bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 diidentifikasi pada media agar darah. Mulai dengan menginokulasikan suspensi bakteri ke dalam media, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya hemolisis alfa (α) diikuti warna hijau pada koloni bakteri.

Kedua, bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 diidentifikasi dengan metode pewarnaan Gram. Kaca objek dibersihkan dengan kapas yang telah diberi alkohol lalu diberi label. Mengambil biakan bakteri dengan menggunakan jarum Ose, lalu dioleskan pada bagian tengah kaca preparat. Kemudian ditambahkan 1 tetes larutan kristal violet dan dibiarkan mengering selama \pm 1 menit, setelah itu

dicuci dengan air mengalir secara perlahan hingga warna turun dan dikeringkan dengan tissue secara perlahan jangan ditekan kuat atau juga digosok. Selanjutnya kaca preparat ditetesi larutan lugol sebanyak 1 tetes didiamkan selama \pm 1 menit, lalu dibilas dengan alkohol 95% kemudian cuci dengan air mengalir dan dikeringkan kembali dengan tissue secara perlahan. Selanjutnya diberikan 1 tetes larutan safranin lalu didiamkan selama \pm 30 detik lalu cuci kembali dengan air mengalir dan keringkan dengan tissue. Amati kaca preparat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 100x. Hasil dicatat kemudian difoto. Bakteri yang tetap berwarna ungu meskipun disertai pewarna oleh zat warna kontras merupakan bakteri Gram positif (Muhtar *et al.* 2017).

Ketiga, bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 diidentifikasi dengan metode biokimia. Ada dua uji yakni uji katalase dan koagulasi. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada BHI dan ditambah H₂O₂ 3%. Hasil positif ditunjukkan adanya gelembung udara, hasil negatif ditunjukkan tidak adanya gelembung udara. *Streptococcus mutans* bersifat katalase negatif sehingga hasil yang terbentuk tidak terdapat gelembung udara (Abdullah 2010).

Uji koagulasi digunakan untuk mengetahui adanya koagulasi bebas dengan cara 200 μ l plasma sitrat dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril. Sebanyak 3-4 koloni biakan *Streptococcus mutans* yang diuji ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dicampur. Kemudian, tabung dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C. Diamati pada 4 jam pertama dan sesudah 18-24 jam. Hasil positif ditunjukkan terbentuknya *jelly*, ketika tabung dimiringkan *jelly* tetap berada di dasar tabung (Dewi 2013).

17. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

Obat kumur yang diperoleh dari formulasi ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.) diuji mikrobiologi pada bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Metode yang digunakan yakni uji difusi. Uji difusi digunakan untuk mengetahui zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi sediaan.

Uji difusi dimulai dengan membuat media MHA menggunakan panci, lalu dituang ke dalam erlenmeyer, tunggu hingga media tidak terlalu panas sehingga dapat membuat bakteri terbunuh, lalu dengan pengerjaan aseptis di dalam inkas

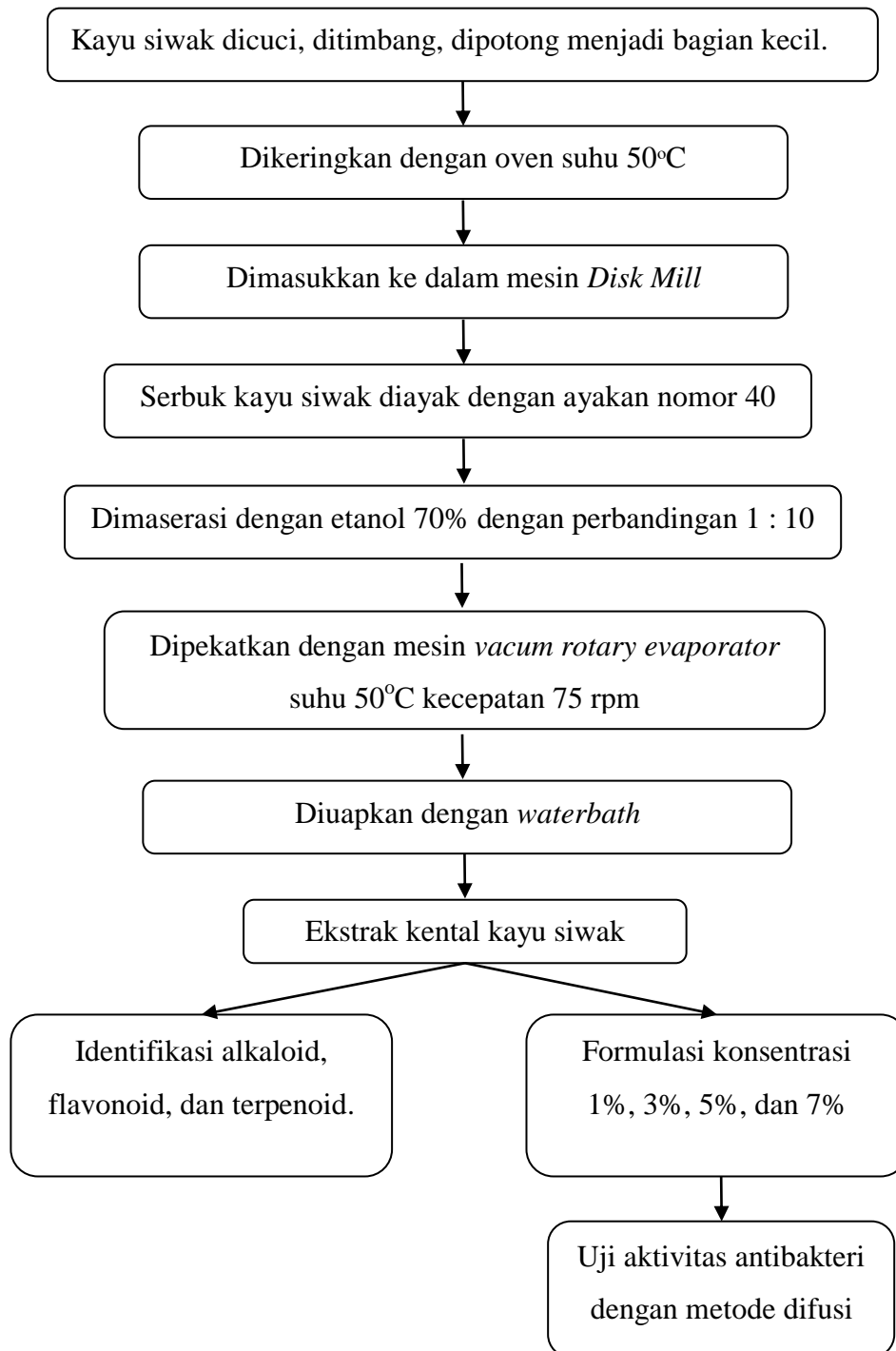
menuangkan media MHA sebanyak ± 50 ml ke dalam cawan petri, kemudian mengambil suspensi bakteri yang sudah sesuai dengan standar Mc Farland 0,5 sebanyak ± 1 ml menggunakan pipet volume lalu dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah diisi media MHA, setelah itu cawan petri digoyangkan memutar agar suspensi bakteri dapat tercampur merata ke dalam media MHA, dan ditunggu hingga memadat. Setelah memadat, cawan dibalik dan dibuat 6 daerah uji untuk 4 variasi konsentrasi obat kumur, 1 kontrol positif, dan 1 kontrol negatif.

Selanjutnya mengisi cakram kosong dengan sampel uji, kontrol positif, dan kontrol negatif dengan menggunakan mikropipet sebanyak 50 μ L. Kemudian cakram yang telah diisi dengan sampel uji, kontrol positif, dan kontrol negatif diletakkan ke dalam cawan petri berisi campuran media dan suspensi bakteri sesuai daerah yang telah dibuat untuk masing-masing sampel uji. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam dan diamati hasilnya. Diameter zona hambat sekitar kertas cakram diukur dan dinyatakan dalam satuan mm. Hasil dapat dilihat dengan terbentuknya area jernih yang menandakan adanya penghambatan oleh obat kumur ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* Linn.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Pratiwi 2008).

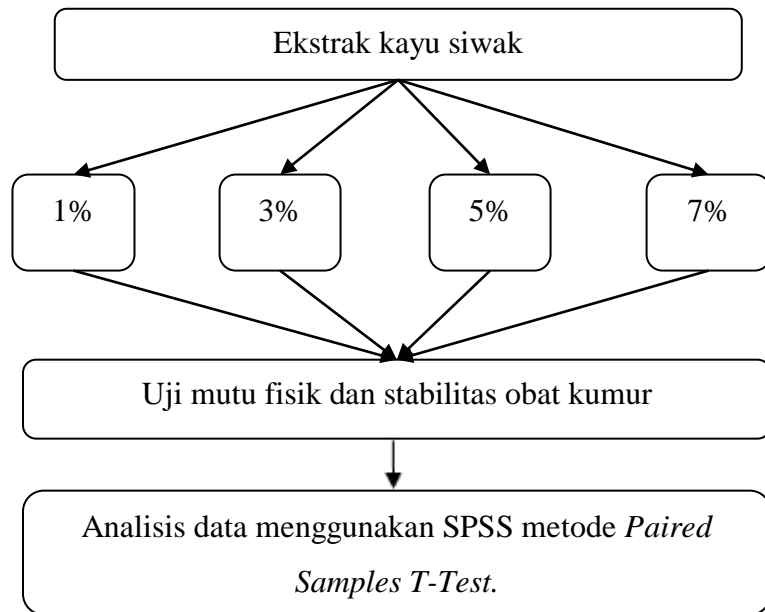
E. Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh, tahap selanjutnya data dianalisis data menggunakan program statistik SPSS 21.0 dengan metode Kolmogorov-Smirnov. Jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka dilanjutkan dengan analisis Homogenitas dan *Lavene Test* menggunakan metode *One Way Anova*, *Tukey HSD* dengan taraf kepercayaan 95%. Tujuan dilakukannya uji menggunakan metode *One Way Anova*, *Tukey HSD* adalah untuk mengetahui konsentrasi yang berpengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lain.

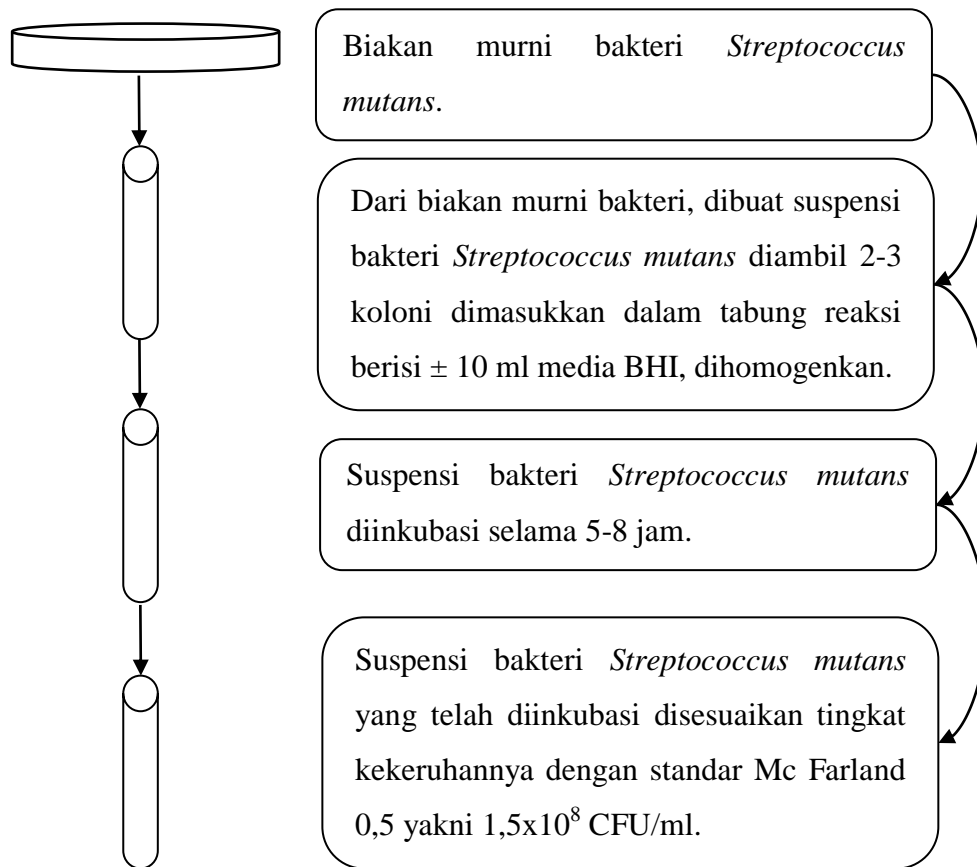
F. Skema Penelitian



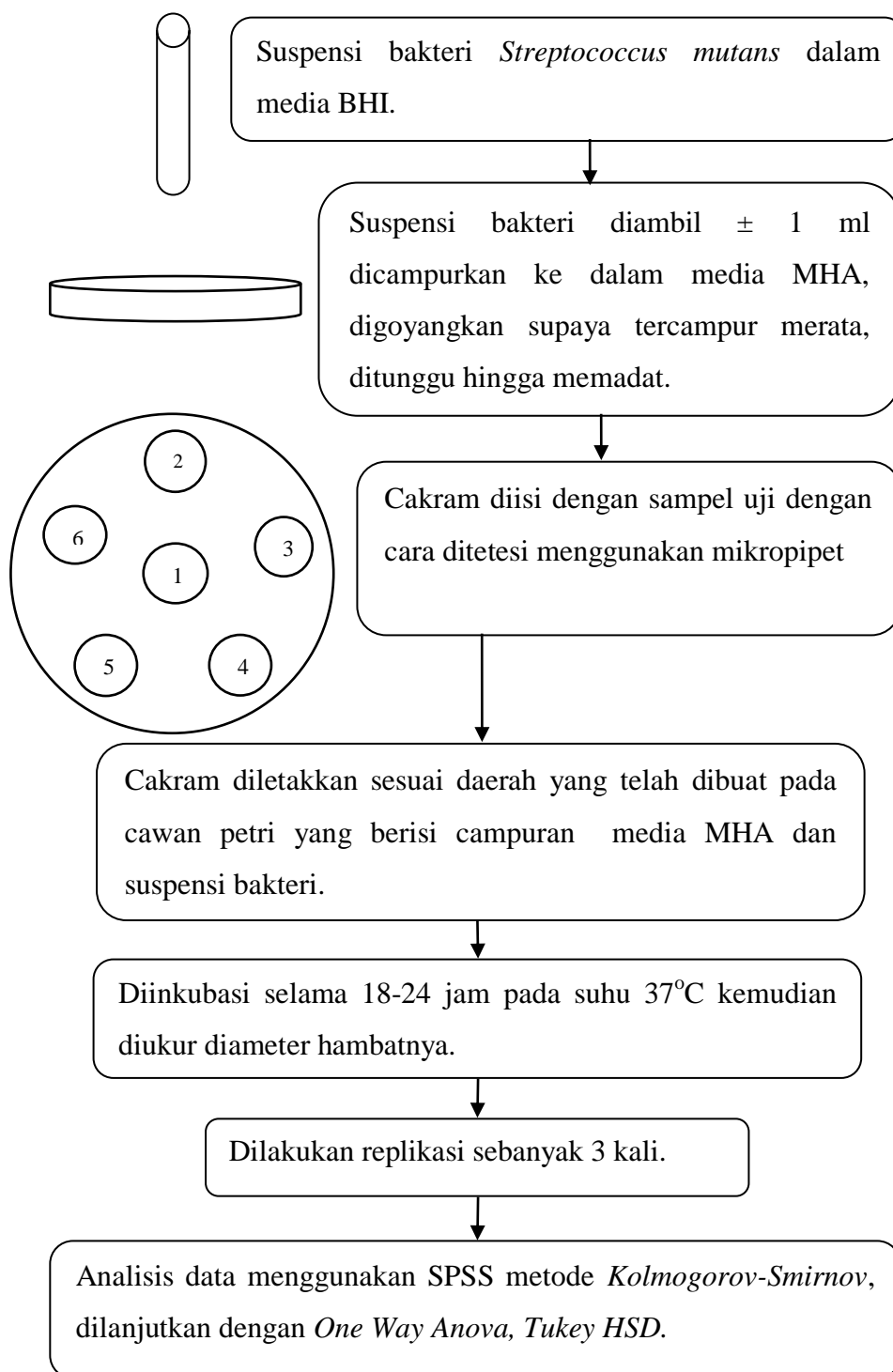
Gambar 1. Pembuatan ekstrak kayu siwak



Gambar 2. Pembuatan obat kumur ekstrak kayu siwak



Gambar 3. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175



*Keterangan : (1) Kontrol positif produk obat kumur “X”, (2) Obat kumur ekstrak kayu siwak konsentrasi 1%, (3) Obat kumur ekstrak kayu siwak konsentrasi 3%, (4) Obat kumur ekstrak kayu siwak konsentrasi 5%, (5) Obat kumur ekstrak kayu siwak konsentrasi 7%, (6) Kontrol negatif obat kumur tanpa penambahan ekstrak.

Gambar 11. Pengujian obat kumur ekstrak kayu siwak dengan metode difusi