

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

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

Populasi adalah kelompok subyek penelitian ditetapkan sebagai kriteria tertentu didapatkan dari hasil penelitian untuk menjadi target kesimpulan. Populasi yang digunakan adalah ekstrak buah kapulaga.

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

Sampel adalah sebagian diambil dari populasi yang dapat mewakili populasi penelitian. Sampel yang digunakan penelitian ini adalah pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga dengan variasi konsentrasi karbopol 940 dan gliserin berturut-turut adalah (0,5:2), (1:1,5), (1,5:1), dan (2:0,5).

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

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga dibuat dengan variasi konsentrasi karbopol 940 sebagai *gelling agent* dan gliserin sebagai *humectan* dan pengujian mutu fisik pasta gigi gel dengan berbagai macam pengujian dan uji daya hambat terhadap *Streptococcus mutans*.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahan timbulnya variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi dari karbopol 940 dan gliserin dalam pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga.

Variabel kendali adalah variabel yang dikendalikan sehingga hubungan variabel bebas terhadap variabel terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah cara pembuatan pasta gigi gel, kondisi peneliti, dan kondisi laboratorium penelitian.

Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga terhadap *Streptococcus*

*mutans* dilihat dari besarnya zona hambat dan kestabilan fisik pasta gigi gel meliputi pengujian homogenitas, organoleptik (warna, bau, dan tekstur), viskositas, pH, daya sebar, dan tinggi busa yang dilakukan setelah pembuatan sediaan pasta gigi gel.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, buah kapulaga (*Amomum compactum* S.) adalah buah yang berwarna coklat keputihan yang diambil dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak buah kapulaga adalah hasil ekstrak yang diperoleh dari maserasi dengan pelarut etanol 96%.

Ketiga, *Streptococcus mutans* adalah bakteri yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keempat, sediaan pasta gigi gel adalah formula yang dibuat dengan mencampurkan semua bahan dengan alat mortir dan stamper.

Kelima, sifat fisik sediaan adalah kualitas fisik yang dihasilkan dari sediaan meliputi homogenitas, organoleptik, viskositas, pH, luas daya sebar dan tinggi busa.

Keenam, metode difusi adalah metode uji aktivitas antibakteri sediaan pasta gigi gel dengan menggunakan kertas cakram untuk melihat diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dalam media uji.

## **C. Bahan dan Alat**

### **1. Bahan**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia kering buah kapulaga yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Bahan tambahan yang digunakan dalam pembuatan pasta gigi gel adalah karbopol 940, Tween 80, gliserin, larutan sorbitol 70%, natrium lauril sulfat, sodium benzoat, TEA, dan aquadest.

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Blood Agar* (BA), dan *Nutrient Agar* (NA). Pensuspensi bakteri yaitu larutan NaCl 0,9%.

## **2. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol maserasi yang terbuat dari gelas dan berwarna gelap, oven binder FD53, moisture balance OHAUS MB23, rotary evaporator IKA RV 10 Digital V, tanur THERMOLYNE F6000, penangas air (*waterbath*), *teeth disc mill* Single Phase AC Motor Type JY2A-4, pipet, enkas, mortir dan stamper, cawan petri, desikator, mikroskop YAZUMI L300, autoclave All American Model No 1941X, ose platina, dan alat-alat gelas (Pyrex) seperti tabung reaksi, gelas ukur, Erlenmeyer, gelas bekker, labu takar, dan pipet volume.

Alat yang digunakan untuk uji kestabilan fisik meliputi alat timbang listrik (Lutron GM-500), viskotester VT-04 E RION Ltd, pH meter merk *pH 6+ Eutech Instruments*, *extensometer*, *stopwatch*, dan alat-alat gelas (Pyrex) seperti tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, gelas bekker, labu takar.

## **D. Jalannya Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

### **1. Pengambilan bahan penelitian**

Simplisia kering buah kapulaga diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah yang diambil pada bulan Oktober 2018.

### **2. Identifikasi tanaman**

Tanaman yang diidentifikasi merupakan tanaman segar yang terdiri dari daun, batang, akar, bunga dan buah. Identifikasi tanaman dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang diteliti merupakan kapulaga (*Amomum compactum* Soland.) (Becker dan Brink 1963). Identifikasi tanaman dilakukan

oleh bagian Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.

### **3. Pembuatan serbuk simplisia buah kapulaga**

Buah kapulaga yang telah kering lalu disortasi terhadap bagian-bagian tanaman yang tidak dikehendaki yang mungkin masih ada kotoran dan debu. Simplisia kering tersebut selanjutnya digrinder hingga menjadi simplisia serbuk lalu diayak dengan ayakan mesh no. 40 lalu ditimbang untuk mendapatkan bobot akhir. Simplisia kemudian disimpan dalam wadah yang kering, bersih, dan tertutup rapat (Depkes RI 2000).

### **4. Pembuatan ekstrak buah kapulaga**

Ekstrak dari serbuk kering buah kapulaga dibuat dengan cara maserasi dengan pelarut etanol 96%. Satu bagian serbuk kering kapulaga (500 gram) dimasukkan ke dalam botol maserasi berwarna coklat ditambahkan sepuluh bagian pelarut (5000 ml). Perendaman dilakukan selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Proses penyarian diulangi sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Semua maserat dikumpulkan kemudian dievaporasi menggunakan alat *vacum rotary evaporator* dan pemanasan di atas *waterbath* pada suhu 40-50°C penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (Kemenkes RI 2010). Rendemen ekstrak dihitung dengan membandingkan berat ekstrak total yang dihasilkan dan berat simplisia. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak. Perhitungan rendemen ekstrak dapat dilakukan berdasarkan persamaan berikut:

$$\text{rendemen(\%)} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{bobot serbuk simplisia kering}} \times 100\%$$

### **5. Karakterisasi ekstrak buah kapulaga**

**5.1. Pemeriksaan organoleptik.** Ekstrak yang diperoleh diuji secara organoleptik. Pemeriksaan ini menggunakan pengamatan panca indera meliputi bentuk, warna, bau dan rasa dari ekstrak.

**5.2. Penetapan berat jenis.** Tujuan dari penetapan berat jenis adalah untuk memberikan batasan besarnya massa per satuan volume (Depkes RI 2000). Penentuan nilai berat jenis dilakukan dengan pengenceran ekstrak sebesar 1% yang kemudian diukur beratnya menggunakan piknometer. Perhitungan berat jenis ekstrak dapat dilakukan berdasarkan persamaan berikut:

$$\text{berat jenis ekstrak} = \frac{W_3 - W_1}{W_3 - W_2}$$

Keterangan

$W_1$  = piknometer kosong yang bersih dan kering diukur bobotnya

$W_2$  = piknometer berisi aquadest diukur bobotnya

$W_3$  = piknometer berisi pengenceran ekstrak diukur bobotnya

**5.3. Penetapan susut pengeringan.** Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan dengan cara yang telah ditetapkan. Ekstrak buah kapulaga ditimbang secara seksama sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal tutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang ekstrak diratakan dalam botol timbang, dengan batang pengaduk, hingga terdapat lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm. kemudian dimasukkan ke dalam ruang pengeringan, buka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum pengeringan biarkan botol dalam keadaan tertutup dingin dalam desikator hingga suhu kamar. Dilakukan pengulangan 3 kali. Susut pengeringan dihitung dengan persamaan sebagai berikut (Depkes RI 2000):

$$\text{susut pengeringan (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Bobot sebelum dipanaskan (gram)

B = Bobot sesudah dipanaskan (gram)

**5.4. Penetapan kadar air.** Ekstrak ditimbang sebanyak 10 gram, dimasukkan ke dalam labu kering. Sebanyak 100 ml toluen jenuh air dimasukkan ke dalam labu, kemudian rangkaian alat dipasang. Toluene jenuh air dimasukkan ke dalam tabung penerima melalui tabung pendingin sampai leher alat penampung. Labu dipanaskan menggunakan bunsen selama 15 menit. Setelah toluene mulai mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan lebih kurang dari 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian kecepatan

dinaikkan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Volume air dibaca setelah air dan toluen memisah sempurna. Dilakukan pengulangan 3 kali. Kadar air dihitung dalam % v/b (Dirjen POM 2008):

$$\text{kadar air (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A= Bobot sampel sebelum dikeringkan (gram)

B= Bobot sampel sesudah dikeringkan (gram)

**5.5. Penetapan kadar abu.** Penetapan kadar abu dilakukan pada ekstrak buah kapulaga. Ekstrak ditimbang sebanyak 2 gram lalu dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan pada suhu 600°C dan telah ditara. Ekstrak dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis sampai menjadi abu, setelah itu ditunggu sampai dingin di dalam alat desikator, lalu ditimbang hingga beratnya konstan. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas, diaduk, disaring melalui kertas saring bebas abu. Kertas saring dipijarkan beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan dan dipijarkan hingga bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (tidak lebih dari 0,5 mg). Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji dinyatakan dalam % b/b (Dirjen POM 2008):

$$\text{kadar abu (\%)} = \frac{\text{bobot abu yang diperoleh}}{\text{bobot sampel}} \times 100\%$$

## 6. Uji kandungan kimia ekstrak buah kapulaga

**6.1. Identifikasi golongan alkaloid.** Sebanyak 50 mg ekstrak dimasukkan ke dalam mortir ditambahkan 5 ml ammonia 30% dan digerus kuat dalam mortir kemudian ditambahkan 20 ml kloroform digerus dan yang terakhir disaring. Filtrat berupa larutan organik (sebagai larutan A). Beberapa tetes larutan A diteteskan pada kertas saring disemprot atau ditetesi dengan pereaksi Dragendorff. Warna yang terbentuk yaitu warna merah atau jingga pada kertas saring menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Larutan A dibagi dalam dua tabung reaksi, masing-masing ditambahkan pereaksi Dragendorff dan Mayer, terbentuknya endapan merah bata dengan pereaksi Dragendorff dan endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan adanya senyawa alkaloid

**6.2. Identifikasi golongan flavonoid.** Sebanyak 50 mg ekstrak ditambahkan 100 ml air dan dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring diperoleh filtrat yang digunakan sebagai larutan percobaan (larutan A). Sebanyak 5 ml larutan percobaan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan serbuk magnesium secukupnya ditambahkan 1 ml asam klorida pekat dan 5 ml amilalkohol dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Warna yang terbentuk yaitu warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amilalkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

**6.3. Identifikasi golongan saponin.** Sebanyak 10 ml larutan percobaan (larutan A) dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok kuat selama 10 detik secara vertikal kemudian dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa yang stabil dalam tabung reaksi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin, bila ditambahkan 1 tetes asam klorida 1% (encer) busa tetap stabil.

**6.4. Identifikasi golongan polifenol.** Polifenol dapat dideteksi dengan penambahan besi (III) klorida dengan memberikan warna ungu dan uji daya reduksi yaitu dengan penambahan Fehling A dan Fehling B pada bahan sehingga membentuk endapan merah bata (Harbone 1987).

**6.5. Identifikasi golongan tanin.** Sebanyak 50 mg ekstrak ditambahkan 100 ml air dididihkan selama 15 menit didiamkan sampai dingin dan disaring kemudian filtrat dibagi menjadi dua bagian (filtrat A dan B). Filtrat A ditambahkan larutan ferriklorida 1% secukupnya. Warna yang terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa golongan tanin. Filtrat B ditambahkan 15 ml pereaksi Stiasny (formaldehid 30% : asam klorida pekat 2 : 1) dipanaskan di atas penangas air. Endapan terbentuk warna merah muda menunjukkan adanya tanin katekuat. Selanjutnya endapan disaring, filtrat dijenuhkan dengan natrium asetat, ditambahkan beberapa tetes larutan ferriklorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat.

**6.6. Identifikasi golongan kuinon.** Sebanyak 5 ml larutan percobaan (larutan A) dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N. Warna yang terbentuk warna merah menunjukkan adanya senyawa golongan kuinon.

**6.7. Identifikasi golongan steroid/triterpenoid.** Sebanyak 50 mg ekstrak dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam (dalam wadah dengan penutup rapat) disaring dan diambil filtratnya. Sebanyak 5 ml filtrat diuapkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu. Residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Lieberman-Burchard). Warna yang terbentuk warna hijau atau merah menunjukkan adanya senyawa golongan steroid atau triterpenoid.

**6.8. Identifikasi golongan minyak atsiri.** Sebanyak 50 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 ml petroleum eter. Pada mulut tabung dipasang corong yang diberi lapisan kapas yang telah dibasahi dengan air, kemudian dipanaskan selama 10 menit di atas tangas air. Setelah dingin, disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh diuapkan pada cawan penguap sampai kering sehingga diperoleh residu. Residu dilarutkan dalam etanol sebanyak 5 ml dan disaring dengan kertas saring. Filtratnya diuapkan pada cawan penguap, jika residu berbau aromatik menunjukkan adanya senyawa golongan minyak atsiri.

## **7. Pembuatan sediaan pasta gigi gel**

Alat dan bahan disiapkan dan ditimbang sesuai dengan komposisi yang akan dibuat dalam sediaan. Karbopol 940 dimasukkan dalam mortir panas kemudian didispersikan dengan aquadest sebanyak 50 ml dan diaduk dengan stamper secara kuat-kuat sampai konstan dan homogen hingga terbentuk basis gel. Trietanolamin ditambahkan sedikit demi sedikit untuk menetralkan basis gel dan meningkatkan kekentalan gel dan ditambahkan gliserin kemudian diaduk hingga homogen sampai terbentuk massa (M1).

Ekstrak buah kapulaga ditambahkan larutan sorbitol 70% hingga larut. Selanjutnya sodium benzoat dilarutkan dengan aquadest panas 10 ml diaduk hingga larut sampai dingin, tween 80 ditambahkan sedikit demi sedikit bersama dengan aquadest secukupnya Sediaan distirer dengan kecepatan 300 rpm dengan suhu kamar hingga homogen dan jernih (M2).

Natrium lauril sulfat dimasukkan ke dalam gelas bekket dan dilarutkan dengan air panas terlebih dahulu sedikit demi sedikit aduk secara perlahan



menggunakan batang pengaduk hingga homogen, sebelum dicampurkan dengan bahan lainnya (M3). Dalam mortir (M2) dicampurkan (M1) diaduk hingga semua bahan tercampur homogen kemudian ditambahkan (M3) diaduk secara perlahan-lahan hingga homogen sampai terbentuk pasta gel yang mengembang. Tahap terakhir formula dimasukkan dalam wadah.

## 8. Rancangan formulasi sediaan pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga

**Tabel 2. Formula pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga dengan variasi konsentrasi karbopol 940 sebagai pembentuk gel dan gliserin sebagai bahan pelembab.**

Komposisi	Berat (gram) pada formula							
	KF1	F1	KF2	F2	KF3	F3	KF4	F4
Ekstrak buah kapulaga		1		1		1		1
Karbopol 940	0,5	0,5	1	1	1,5	1,5	2	2
Tween 80	10	10	10	10	10	10	10	10
Gliserin	2	2	1,5	1,5	1	1	0,5	0,5
Sorbitol 70%	15	15	15	15	15	15	15	15
Natrium lauril sulfat	2	2	2	2	2	2	2	2
Sodium benzoate	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEA	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Aquadest hingga	100	100	100	100	100	100	100	100

Keterangan:

F1 : karbopol 940 + gliserin + ekstrak buah kapulaga = (0,5:2:1)

F2 : karbopol 940 + gliserin + ekstrak buah kapulaga = (1:1,5:1)

F3 : karbopol 940 + gliserin + ekstrak buah kapulaga = (1,5:1:1)

F4 : karbopol 940 + gliserin + ekstrak buah kapulaga = (2:0,5:1)

KF1 : karbopol 940 + gliserin = (0,5:2)

KF2 : karbopol 940 + gliserin = (1:1,5)

KF3 : karbopol 940 + gliserin = (1,5:1)

KF4 : karbopol 940 + gliserin = (2:0,5)

## 9. Pemeriksaan mutu fisik sediaan pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga

Uji yang dilakukan pada sediaan pasta gigi gel yaitu homogenitas, organoleptis, viskositas, pH, luas daya sebar, tinggi busa, dan aktivitas antibakteri. Pengujian terhadap sediaan pasta gigi gel dilakukan setelah pembuatan dan dilakukan pengulangan 3 kali selama 21 hari.

**9.1. Uji homogenitas.** Pasta gigi gel yang akan diuji dioleskan sebanyak 0,5 gr pada gelas obyek untuk diamati homogenitasnya secara visual. Pasta gigi gel dikatakan homogen apabila tidak terdapat butiran kasar di atas gelas obyek tersebut.

**9.2. Uji organoleptik.** Pengujian organoleptik dilakukan dengan mengamati perubahan warna, bau, dan tekstur yang terjadi dalam sediaan pasta gigi gel.

**9.3. Uji viskositas.** Kekentalan diukur menggunakan alat viskotester VT-04 E RION Ltd menggunakan spindle no. 1 dan no. 2. Pengujian pasta gigi gel dilakukan dengan cara spindle dimasukkan ke dalam sampel sampai kedalaman tertentu. Spindle diputar dengan menggunakan arus listrik sampai jarum viscometer menunjukkan angka tertentu. Hasil pengukuran viskositas tersebut lalu didapat angka yang akan ditampilkan dalam monitor viskometer dinyatakan dalam *Decipascal second*. Pengukuran viskositas ini dilakukan pada suhu kamar. Syarat mutu viskositas pada sediaan pasta gel yaitu 20-500 dPa•s agar tidak mengiritasi mukosa mulut (Badan Standar Nasional 1995).

**9.4. Uji pH.** Pengukuran pH dilakukan dengan alat pH meter merk *pH 6+ Eutech Instruments*. Alat terlebih dahulu dikalibrasi dengan menggunakan larutan dapar standar netral (pH 7,01) dan larutan dapar pH basa (pH 10,01) hingga alat menunjukkan nilai pH tersebut. Kemudian elektroda dicuci dengan aquades, lalu dikeringkan dengan tissue. Sampel dibuat dalam konsentrasi 1% yaitu dengan menimbang 0,5 gram sediaan dan ditambahkan aquadest sampai 50 ml. Elektroda dicelupkan dalam larutan sampel kemudian dibiarkan sampai menunjukkan nilai pH konstan. Angka yang ditunjukkan pH meter merupakan pH sediaan (Rawlins 2003). Pengukuran pH pasta gigi gel diulangi sebanyak tiga kali tiap formulanya. Syarat mutu pH pada sediaan pasta gel yaitu 4,5-10,5 agar tidak mengiritasi mukosa mulut (Badan Standar Nasional 1995).

**9.5. Uji luas daya sebar.** Uji luas daya sebar dilakukan menggunakan alat *extensometer*, anak timbang gram dan penggaris. Pengujian pasta gigi gel dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram pasta gigi gel diletakkan di tengah kaca berskala, di atas massa pasta gigi gel diberi kaca penutup dan dibiarkan 1 menit. Diameter gel yang menyebar (diukur dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi). Kemudian ditambah 50 gram, 100 gram, dan 150 gram sebagai beban tambahan secara bertahap, setiap penambahan beban didiamkan 1 menit dan dicatat diameter gel yang menyebar seperti sebelumnya.

Syarat mutu diameter daya sebar dan luas daya sebar pada sediaan pasta gel yaitu 2,6095-5,3230 cm dan 5,3481-22,2537 cm<sup>2</sup> (Badan Standar Nasional 1995).

**9.6. Uji tinggi busa.** Pengujian tinggi busa dilakukan dengan cara sebanyak 1 gram sediaan pasta gigi gel ditambahkan air suling lalu dimasukkan ke dalam gelas ukur 100 ml kemudian dilakukan pengocokan selama 20 detik dengan cara membalikkan gelas ukur secara beraturan diamkan selama 5 menit. Tinggi busa diukur menggunakan penggaris. Syarat mutu tinggi busa pada sediaan pasta gigi gel yaitu tidak melebihi 15 cm (Badan Standar Nasional 1995).

## **10. Identifikasi bakteri uji *Streptococcus mutans***

**10.1. Identifikasi mikroskopis.** Identifikasi ini dilakukan dengan cara pengecatan Gram. Tahap pertama membuat apusan di atas obyek glass kemudian dilakukan fiksasi. Tahap kedua dilakukan pewarnaan Gram A yang berisi kristal violet diteteskan selama 1 menit kemudian dicuci selanjutnya pewarnaan Gram B yang berisi larutan KI dan I<sub>2</sub> diteteskan selama 1 menit. Tahap ketiga dicuci kembali dan selanjutnya pewarnaan gram C yang berisis etanol diteteskan sebagai peluntur selama 30 detik kemudian dicuci. Tahap terakhir pewarnaan gram D yang berisi safranin diteteskan selama 1 menit kemudian dicuci dan dikeringkan setelah kering diamati dengan mikroskop. Jika didapat hasil berbentuk *coccus* atau bulat yang secara khas membentuk pasangan berderet seperti rantai dan berwarna violet maka hasil pewarnaan adalah Gram positif bakteri *Streptococcus mutans*.

**10.2. Uji makroskopis.** Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil bakteri *Streptococcus mutans* dari kultur murni kemudian dikultur pada media *Blood Agar* (BA). Media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C kemudian diamati perubahan warna terjadi. Perubahan yang terjadi pada media *Blood Agar* (BA) yaitu adanya hemolisis pada sel darah merah dengan adanya koloni berwarna putih dengan tepian koloni berwarna hijau.

**10.3. Uji biokimia.** Uji biokimia digunakan untuk spesies yang secara khas tidak bereaksi dengan antibodi yang umumnya digunakan untuk zat golongan spesifik. Identifikasi bakteri uji dilakukan dengan uji biokimia untuk bakteri Gram Positif (uji katalase dan uji koagulase) (Jawetz *et al.* 1995).

**10.3.1. Uji katalase.** Pengujian ini dilakukan dengan cara mengoleskan bakteri biakan murni *Streptococcus mutans* pada obyek glass selanjutnya ditetesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebanyak 1 tetes. Diamati adanya gelembung untuk hasil positif dan apabila tidak ada gelembung menunjukkan hasil negatif. Uji katalase dengan hasil negatif menunjukkan adanya koloni *Streptococcus mutans* (Ambarwati 2017).

**10.3.2. Uji koagulase.** Pengujian ini dilakukan dengan cara memasukkan bakteri *Streptococcus mutans* dalam plasma sitrat, selanjutnya diamati ada tidaknya gumpalan yang terbentuk. Hasil uji koagulase dikatakan positif apabila terbentuk gumpalan. Uji koagulase dengan hasil positif menunjukkan adanya koloni *Streptococcus mutans* (Ambarwati 2017).

## **11. Uji aktivitas antibakteri sediaan pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga**

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi cakram. Metode ini dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (*clear zone*) yang merupakan respon adanya penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak buah kapulaga pada sediaan formula pasta gigi gel.

**11.1. Sterilisasi.** Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan sebelum disterilkan. Alat-alat gelas seperti tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, dan pipet ditutup mulutnya dengan kapas kemudian dibungkus dengan kertas perkamen dan semua cawan petri dibungkus satu persatu dengan kertas perkamen. Semua alat disterilkan di dalam autoclave pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit. Pinset dan jarum ose disterilkan dengan cara memflambir pada lampu spiritus. Lemari aseptis dibersihkan dari debu lalu disemprotkan dengan etanol 70% (Hadioetomo 1990).

**11.2. Penanaman bakteri uji pada media agar miring.** Kultur bakteri *Streptococcus mutans* yang didapat dari Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi diambil menggunakan jarum ose bundar sebanyak 1 ose. Bakteri *Streptococcus mutans* 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).

### **11.3. Pembuatan standar kekeruhan larutan (Larutan *Mc. Farland*).**

Larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sebanyak 9,5 ml dicampurkan dengan larutan BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O sebanyak 0,5 ml dalam erlenmeyer. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Handayani *et al.* 2016).

**11.4. Pembuatan suspensi bakteri uji.** Bakteri uji yang telah diinokulasi pada media agar miring kemudian diambil dengan jarum ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl 0,9 % (0,09 g serbuk NaCl dilarutkan dalam 10 ml air) hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc. Farland*. Standar Mc Farland 0,5 setara dengan suspensi bakteri mengandung antara  $1 \times 10^8$  dan  $2 \times 10^8$  CFU/ml (Handayani *et al.* 2016).

**11.5. Uji daya hambat.** Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan cawan petri sebanyak 3 buah berdiameter 14 cm dan kertas cakram sebanyak 27 buah dengan diameter 6 mm. Media MHA yang masih cair sebanyak 45 ml dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri dan media dibiarkan memadat pada suhu kamar. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri kemudian ditiriskan dan diusapkan pada permukaan media MHA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dan ditunggu hingga 5 menit agar suspensi terdifusi dalam media. Proses perendaman kertas cakram dilakukan terhadap pengenceran 4 formula uji, 4 formula pembanding kontrol negatif (pasta gigi gel tanpa ekstrak buah kapulaga) dan 1 kontrol positif (antibiotik ciprofloksasin) dibiarkan selama 1 jam hingga larutan terdifusi ke dalam kertas cakram. Kertas cakram yang telah direndam dalam masing-masing formula ditempelkan pada masing-masing cawan petri yang sebelumnya sudah diberi nama. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Lalu cawan petri diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C (Handayani *et al.* 2016).

**11.6. Pengamatan hasil pengujian aktivitas antibakteri.** Setelah 24 jam diamati ada tidaknya zona bening di sekitar kertas cakram. Zona bening yang terbentuk diukur diameternya menggunakan jangka sorong atau penggaris.

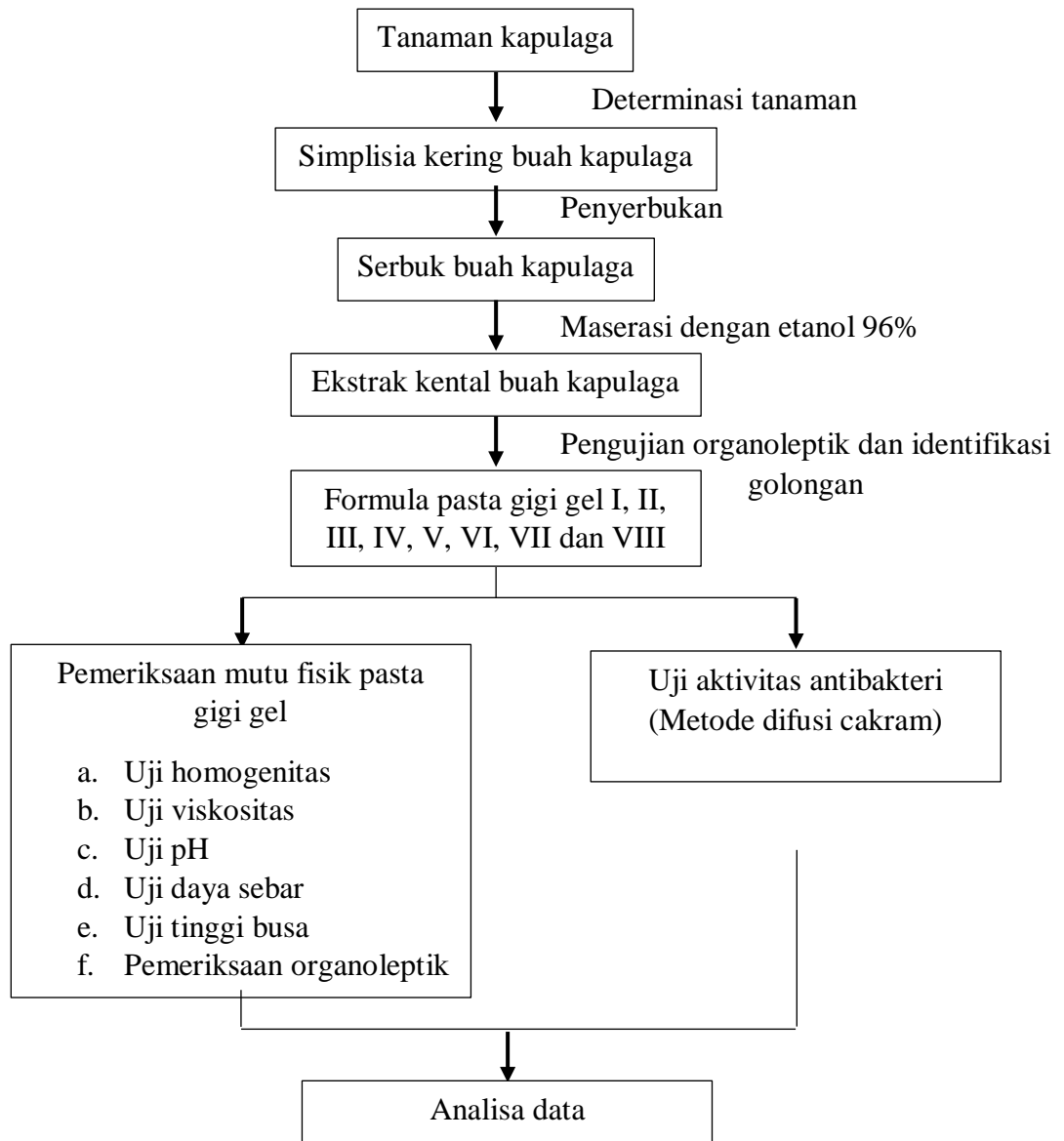
Adanya daerah bening di sekeliling kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas antibakteri.

#### **E. Cara Analisis Data**

Data yang diperoleh berupa mutu fisik meliputi homogenitas, organoleptik, viskositas, pH, luas daya sebar, tinggi busa dan daya hambat antibakteri. Data uji homogenitas dan uji organoleptik menggunakan pengamatan deskriptif. Data uji viskositas, uji pH, uji luas daya sebar dan uji tinggi busa dianalisa menggunakan SPSS dengan analisis *kolmogorov-smirnov*, apabila data yang diperoleh terdistribusi secara normal maka dilanjutkan dengan analisis *paired samples t-test*. Apabila data terdistribusi secara tidak normal maka dilanjutkan dengan analisis *Wilcoxon*. Data daya hambat antibakteri dianalisa dengan menggunakan SPSS dengan analisis *kolmogorov-smirnov*, apabila data yang diperoleh terdistribusi secara normal maka dilanjutkan dengan analisis *one way anova*. Apabila data terdistribusi secara tidak normal maka dilanjutkan dengan analisis *Kruskal-wallis*.

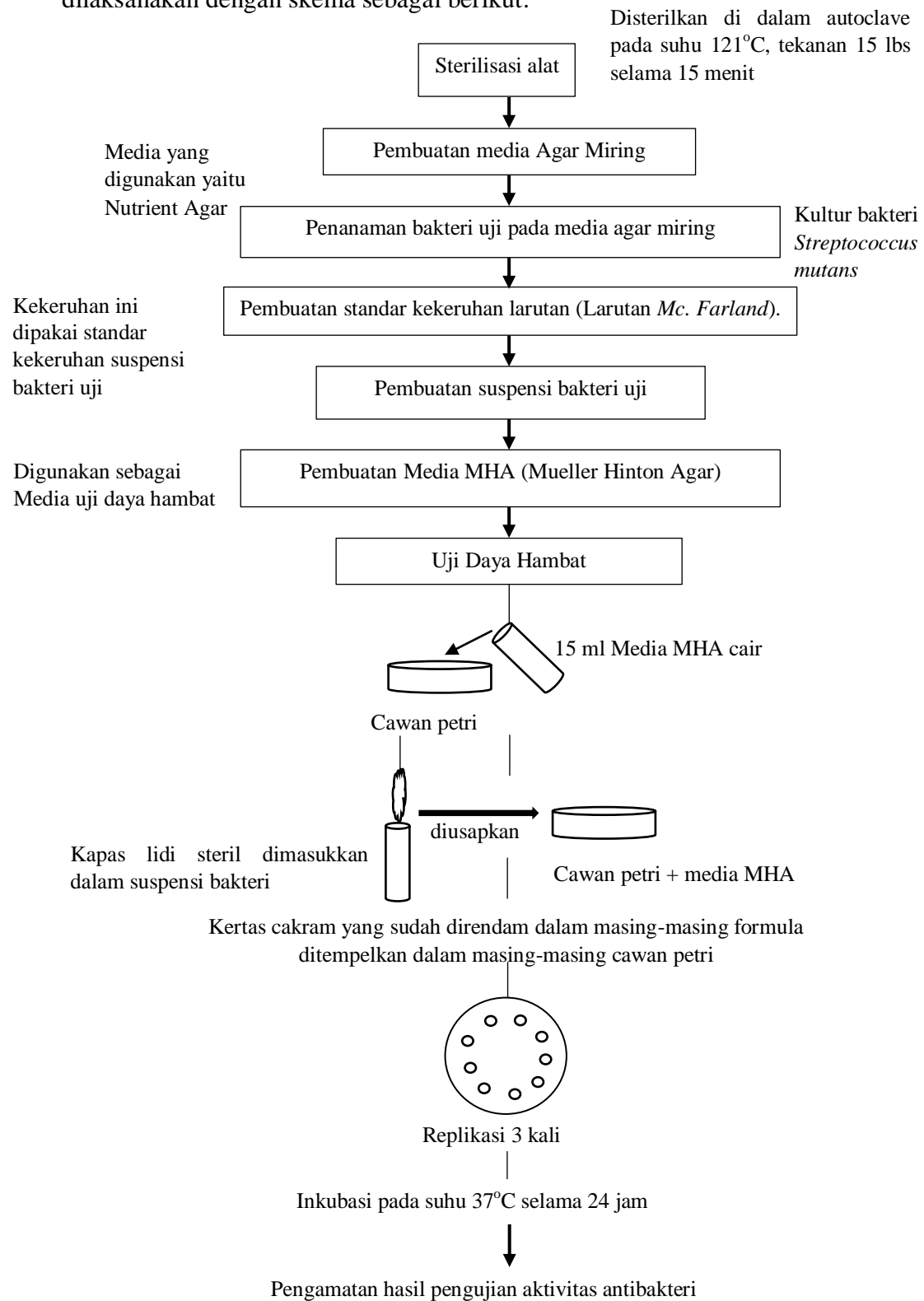
#### **F. Skema Jalannya Penelitian**

Skema kerja formulasi sediaan pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga (*Amomum compactum* S.) dan uji aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dapat dilihat pada gambar 3 dan gambar 4.



Gambar 3. Skema pembuatan pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga

Pengujian aktivitas antibakteri sediaan pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga dilaksanakan dengan skema sebagai berikut:



**Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri pasta gigi gel ekstrak buah kapulaga**