

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi Sampel

Populasi merupakan keseluruhan dari suatu objek yang dijadikan sebagai dasar penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah buah andaliman (*Zanthoxylum ancanthopodium* DC) yang diperoleh dari daerah Delok Sanggul, Humbang Hasundutan, Sumatera Utara dan sediaan *gummy candy* variasi gelatin dan maltodekstrin.

Sampel merupakan sebagian dari populasi yang ingin di teliti dimana keberadaannya diharapkan mampu menggambarkan keberadaan populasi yang sebenarnya. Sampel dalam penelitian ini yang digunakan adalah buah andaliman (*Zanthoxylum ancanthopodium* DC) yang sudah siap panen dan dipetik secara acak dari daerah yang diperoleh dari daerah Delok Sanggul, Humbang Hasundutan, Sumatera Utara dan sediaan *gummy candy* dengan bahan aktif buah andaliman (*Zanthoxylum ancanthopodium* DC) dengan variasi gelatin dan maltodekstrin 80,9% : 19,1 %, 84,5% : 15,5%, dan 88% : 12,%,

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama, ekstrak buah andaliman (*Zanthoxylum ancanthopodium* DC) yang diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.

Variabel utama kedua, formulasi *gummy candy* ekstrak (*Zanthoxylum ancanthopodium* DC) dengan variasi gelatin dan maltodekstrin.

Variabel utama ketiga, mutu, stabilitas fisik dan aktivitas antibakteri *gummy candy* ekstrak buah andaliman (*Zanthoxylum ancanthopodium* DC).

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang sudah diidentifikasi dapat diklasifikasikan menjadi beberapa variabel antara lain variabel bebas, variabel kendali, serta variabel tergantung.

Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja dimodifikasi guna dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi gelatin dan maltodekstrin

pada formulasi *gummy candy* ekstrak buah andaliman (*Zanthoxylum ancanthopodium* DC).

Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji yaitu *Streptococcus mutans*, kondisi laboratorium seperti, kesterilan alat dan bahan, media yang digunakan, dan metode ekstraksi.

Variabel tergantung merupakan variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah mutu dan stabilitas fisik sediaan serta aktivitas antibakteri *gummy candy* ekstrak buah andaliman (*Zanthoxylum ancanthopodium* DC).

3. Definisi oprasional variabel utama

Pertama, buah andaliman (*Zanthoxylum ancanthopodium* DC) adalah buah yang digunakan berwarna hijau segar dan siap petik yang diperoleh dari daerah Delok Sanggul, Humbang Hasundutan, Sumatera Utara.

Kedua, serbuk buah andaliman yaitu buah andaliman yang dihasilkan kemudian dibersihkan dengan air yang mengalir guna menghilangkan kotoran yang menempel kemudian dilakukan pengeringan dibawah sinar matahari langsung dengan ditutup kain hitam, setelah kering dilakukan pengayakan menggunakan ayak No. 60.

Ketiga, ekstrak buah andaliman yaitu serbuk buah andaliman yang dilakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 70%.

Keempat, evaluasi mutu fisik sediaan *gummy candy* adalah uji organoleptik dengan menggunakan panca indra (warna, rasa, bau dan tekstur), uji kadar air dilakukan dengan metode oven, uji kadar abu menggunakan oven .

Kelima, evaluasi stabilitas fisik *gummy candy* adalah pengujian stabilitas dilakukan dengan penyimpanan selama 2 minggu pada suhu sejuk (8°C – 15°C), suhu kamar (15 °C - 30°C) dan suhu hangat (30°C - 40°C).

Keenam, bakteri uji penelitian ini adalah *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang didapatkan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketujuh, uji aktivitas antibakteri adalah pengujian dengan metode ALT dengan sediaan yang dibuat dalam konsentrasi 30%, kontrol positif (+), dan kontrol negatif (-).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan antara lain alat-alat gelas, *Laminar Air Flow (LAF)*, kompor gas, blender, timbangan digital, pipet tetes, batang pengaduk, *rotary vacum evaporator*, cawan porselin, kertas saring, kain flanel, corong, cawan petri, inkubator, *Moisture balance*, desikator, mikroskop, jarum ose, kapas lidi steril, oven, autoclave, objek glass, deck glass, ayakan nomor 60, waterbath, nampan, pipet mikro, jangka sorong, botol maserator, tabung reaksi, rak tabung, lemari pendingin, kertas cakram, *magnetic stirrer*, pisau, bunsen, korek api, penggaris, cetakan, dan pinset.

2. Bahan

Bahan antara lain (*Zanthoxylum ancanthopodium* DC), etanol 70%, aquades, gelatin, maltodekstrin, sorbitol, bakteri *Streptococcus mutans*, standar Mc Farland 0,5, pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, pereaksi Dragendorff, HCl pekat, serbuk Mg, FeCl₃, plat klt, H₂SO₄, n-heksana, etil asetat, H₂SO₄ pekat, CH₃COOH, kalium dikromat, alkohol 70%, kristal violet, yodium, safranin, plasma sitrat, H₂O₂ 3%, Amoksisilin, Chlorhexidine, Dimetilsulfoksida 10% (DMSO 10%), NaCl 0,9%, media *Nutrient Agar* (NA), media *Mueller Hinton Agar* (MHA).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman merupakan tahap yang pertama perlu dilakukan, dimana tanaman yang digunakan yaitu tanaman andaliman. Determinasi dilakukan di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu dengan tujuan menyesuaikan keberadaan tanaman yang terkait ciri-ciri morfologi baik secara mikroskopis dan makroskopis terhadap kepustakaan tanaman andaliman.

2. Pengambilan sampel

Buah andaliman (*Zanthoxylum ancanthopodium* DC) yang di dapat dari daerah dari daerah Delok sanggul, Humbang Hasundutan, Sumatera Utara. Pengambilan sampel dilakukan dengan secara acak.

3. Pembuatan simplisia buah andaliman

Tahap pertama dalam pembuatan ekstrak yaitu dengan membuat serbuk simplisia yang dibuat dari simplisia utuh atau potongan halus

yang telah dikeringkan dan diserbuk dengan menggunakan alat tanpa merusak ataupun menghilangkan kandungan kimia yang diperlukan serta ukuran serbuk dibuat dengan cara mengayak serbuk sampai derajat kehalusan tertentu. Derajat kehalusan serbuk simplisia digolongkan menjadi lima yakni serbuk sangat halus, halus, sangat kasar, kasar, dan agak kasar. Pembuatan serbuk berguna supaya luas partikel bahan yang digunakan saat kontak dengan larutan penyari bisa diperluas hingga penyarian berlangsung efektif (Kemenkes RI, 2017).

Serbuk dibuat dengan cara buah andaliman dibersihkan menggunakan air mengalir hingga hilang dari kotoran. Buah andaliman yang sudah dicuci ditiriskan lalu dilakukan penimbangan serta dilakukan pengeringan dibawah sinar matahari langsung dengan ditutup kain hitam sampai kering atau menggunakan oven. Buah andaliman yang telah kering diserbuk menggunakan alat penyerbuk atau blender lalu dilakukan pengayakan menggunakan ayak nomor 60 hingga diperoleh serbuk buah andaliman dengan tingkat derajat kehalusan yang homogen.

3.1. Penetapan susut pengeringan. Pengujian susut kering serbuk buah andaliman menggunakan alat moisture balance, ditimbang serbuk 2 gram dan ditempatkan dalam wadah alumunium foil yang tersedia. Lalu tunggu sampai berat akhir konstan, alat akan berhenti bekerja secara otomatis hingga angka yang ditampilkan (dalam %). Persyaratan susut kering yaitu 10% atau kurang (Kemenkes RI, 2017).

4. Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70 %. Serbuk kering simplisia ditimbang, kemudian dimasukkan 1 bagian serbuk kering simplisia ke maserator dan 10 bagian pelarut. Penelitian ini menggunakan 1000g simplisia halus, kemudian di tambahkan 1000mL etanol 70%. Rendam selama 6 jam pertama sambil dilakukan pengadukan sesekali dan diamkan selama 18 jam. Filtrasi untuk memisahkan maserat. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya 1 kali menggunakan jenis pelarut sama serta jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut saat penyarian pertama. Kumpulkan semua maserat dan uapkan pada vakum penguap sampai didapatkan ekstrak kental (Kemenkes RI, 2017). Rendemen ekstrak buah andaliman dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

4.1 Pengujian kadar air ekstrak. Pengujian kadar air dengan metode gravimetri. Sampel ekstrak buah andaliman ditimbang tidak kurang dari 10gram dan dimasukkan dalam wadah yang sudah ditara. Masukkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam dan kemudian dilakukan penimbangan. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang selang waktu 1 jam hingga bobot konstan. Perbedaan antara dua penimbangan tidak lebih dari 0,025% berturut-turut (Kemenkes RI, 2017).

4.2 Pengujian bebas etanol ekstrak. Pengujian bebas etanol dilakukan sebelum melakukan pengujian aktivitas antibakteri. Pengujian bebas etanol dilakukan guna mengetahui apakah ada atau tidaknya etanol yang terkandung dalam ekstrak sehingga yang didapatkan ekstrak murni. Pengujian bebas etanol dengan cara masukkan 1 mL ekstrak kental ke dalam tabung reaksi, ditambahkan H₂SO₄ dan asam asetat kemudian dipanaskan, ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etil asetat (Tivani *et al.*, 2021).

5. Identifikasi Senyawa Ekstrak

5.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak kental buah andaliman diambil secukupnya kemudian menambahkan 10 mL air panas pada tabung reaksi dan dididihkan. Larutan yang telah mendidih disaring saat masih panas dan filtrat diambil sebanyak 5 mL kemudian tambahkan 0,1 gram serbuk magnesium, 1 mL HCL, dan 2 mL amil alkohol. Kocok semua campuran dan tunggu hingga terjadi pemisahan, adanya senyawa flavonoid ditandai bila di lapisan amil alkohol terbentuk warna kuning, jingga, ataupun merah (Depkes RI, 1995).

5.2 Identifikasi saponin. Ekstrak kental buah andaliman diambil secukupnya dan masukkan tabung reaksi dan menambahkan air panas secukupnya lalu kocok kuat hingga 15 menit. Tambahkan beberapa tetes asam klorida 2N, apabila terbentuk buih selama 10 menit secara permanen artinya hasil positif mengandung saponin (Depkes RI, 1995).

5.3 Identifikasi tanin. Ekstrak kental buah andaliman diambil secukupnya lalu ditambahkan 10 mL aquadest yang kemudian disaring. Masukkan 2 mL filtrat kedalam tabung dan tambahkan dua tetes FeCl₃. Hasil positif terdapat senyawa tanin ditandai dengan terjadinya warna biru kehitaman atau hijau kecoklatan (Andriyanto *et al.*, 2016).

5.4 Identifikasi alkaloid. Sejumlah sampel yang hendak diuji ditambahkan dengan 1 mL HCl 2N dan 9 mL aquades, lalu dipanaskan. Kemudian, filtrat disaring dengan kerta saring dan dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan pereaksi Mayer, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning. Tabung kedua ditambahkan pereaksi Dragendorff, hasil positif ditandai dengan adanya kekeruhan atau terbentuknya endapan berwarna jingga atau kuning. Bagian ketiga ditambahkan dengan pereaksi Bouchardat, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan coklat atau hitam. Jumlah pereaksi 2 dari 3 yang dinyatakan positif maka sampel tersebut dikatakan mengandung senyawa alkaloid (Depkes RI, 1995).

5.5 Identifikasi terpenoid dan steroid. Ekstrak kental buah andaliman ditambahkan asetat anhidrat dan asam sulfat pekat. Uji positif menunjukkan golongan senyawa terpenoid dengan terbentuknya warna merah atau coklat dan warna biru atau hijau untuk steroid (Sangi *et al.*, 2008).

6. Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri *Streptococcus mutans* diambil dari kultur murni sebanyak 1-2 koloni dengan menggunakan jarum ose. Kemudian, bakteri ini diinokulasikan dengan cara digores pada medium Nutrient Agar (NA) miring. Goresan agar yang dihasilkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama periode 18-24 jam (Ifmaily, 2019).

7. Identifikasi Bakteri

7.1 Media agar darah. Uji dilakukan dengan menggoreskan isolat bakteri pada permukaan media agar darah dengan menggunakan kapas lidi steril, kemudian bakteri diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C. Bakteri *Streptococcus mutans* dapat dikatakan memiliki sifat hemolitik jika terbentuk hemolisis alfa (α) yang berada disekitar koloni bakteri menghasilkan warna kehijauan (Jawetz *et al.*, 2007).

7.2 Uji biokimia. Pertama biokimia dengan pengujian katalase dengan cara isolat bakteri ditambahkan H₂O₂ 3%. Hasil positif bila menunjukkan adanya gelembung udara (Abdullah, 2010). Kedua pengujian koagulase dengan cara plasma sitrat dimasukkan dalam tabung reaksi steril secara aseptis, sebanyak 2-3 ose suspensi bakteri uji dimasukkan pada tabung dan dicampurkan. Tabung reaksi selanjutnya inkubasi dengan suhu 37°C, diamati pada 18-24 jam. Hasil positif bila menunjukkan adanya gumpalan plasma didasar tabung reaksi (Dewi, 2013).

7.3 Uji pewarnaan gram. Uji dilakukan dengan cara ose disterilkan pada api bunsen hingga merah membara dan diangin-anginkan dekat dengan api bunsen sebentar supaya ose tetap aseptis. Mengambil bakteri dengan ose yang telah disteril tadi dan diratakan diatas objek glass yang telah dibersihkan menggunakan larutan alkohol 70%. Bakteri yang berada diatas objek glass diberi 1 tetes aquadest dan dikeringkan dengan cara dilewat-lewatkan diatas api bunsen hingga mengering. Pewarnaan diawali dari ditetesi Gram A yaitu kristal violet yang kemudian didiamkan 1 menit lalu dibilas perlahan menggunakan air yang mengalir, setelah dilakukan pembilasan kemudian ditetesi Gram B yaitu larutan yodium dan didiamkan 1 menit lalu dibilas perlahan pada air yang mengalir. Langkah selanjutnya ditetesi Gram C yaitu larutan alkohol 70% dan didiamkan 30 detik dan ditambahkan dengan larutan Gram D yaitu larutan safranin dan dilakukan pengeringan pada sekitar bakteri yang diwarnai. Amati dibawah mikroskop, sebelum diamati objek glass ditetesi dengan larutan imersi yang bertujuan untuk memperjelas bakteri serta menghindari indeks bias. Pengamatan dilakukan perbesaran 100x (Jawetz *et al.*, 2007). *Streptococcus mutans* adalah bakteri Gram positif sehingga hasil pewarnaan Gram yang tampak yaitu warna ungu (Dewi, 2013).

8. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan guna mendapatkan kekeruhan yang sama dari larutan Mc Farland. Pembuatan dilakukan dengan cara 1-2 ose biakan *Streptococcus mutans* yang sudah dilakukan peremajaan pada media NA dimasukkan pada tabung reaksi yang sudah diberi isi larutan NaCl 0,9% sebanyak 10 mL hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc Farland (Wardaniati dan Gusmawarni, 2021). Jika hasil yang didapatkan lebih keruh daripada standar Mc Farland 0,5 maka ditambahkan dengan NaCl 0,9% hingga warna sama dengan standar yaitu setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, sedangkan bila hasil inkubasi lebih jernih dari standar Mc Farland 0,5 maka perlu dilakukan inkubasi lagi dengan menambahkan waktu selama 1-3 jam untuk mengetahui apakah kekeruhan tersebut bertambah atau bisa dengan ditambahkan lagi beberapa ose dari koloni pada media selektif kemudian dilakukan inkubasi selama 1-3 jam. Bakteri pada larutan NaCl 0,9% yang sesuai dengan kekeruhannya adalah larutan stok bakteri *Streptococcus mutans* (Rahmawati, 2019).

9. Uji aktivitas antibakteri ekstrak

Pengujian pertama dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi ekstrak buah andaliman yaitu 15%, 20%, 30% dengan menggunakan DMSO 1% sebagai kontrol negatif dan sediaan tablet tetracyclin sebagai kontrol positif yang diujikan menggunakan media MHA. Media MHA yang sudah dibuat disterilkan masukkan pada cawan petri sebanyak 50 ml secara aseptis di dalam inkas dan ditunggu sampai memadat. Mengambil suspensi bakteri yang sesuai standar Mc Farland 0,5 sebanyak 1 mL dengan pipet volume, kemudian masukkan cawan petri yang sudah diisi media MHA. Cawan petri digoyang-goyangkan memutar seperti angka delapan supaya suspensi dari bakteri dapat bercampur merata dalam media MHA, tunggu sampai memadat. Langkah selanjutnya setelah memadat, cawan petri dibalik dan diberi tanda 5 daerah uji untuk 3 variasi konsentrasi ekstrak, 1 kontrol positif, dan 1 kontrol negatif. Merendam cakram kosong dengan sampel uji, kontrol positif, dan kontrol negatif menggunakan mikropipet 50 μ L. Cakram yang sudah diisi diletakkan pada cawan petri berisi campuran media dan suspensi bakteri sesuai dengan daerah yang sudah dibuat untuk masing-masing sampel uji (Rahmawati, 2019).

Inkubasi selama 18-20 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ (CLSI, 2016). Diameter zona hambat diamati serta diukur terbentuknya zona jernih yang ditandai adanya penghambatan oleh ekstrak buah andaliman terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Pengujian dilakukan replikasi atau pengulangan sebanyak 3 kali (Pratiwi, 2008).

10. Formulasi *Gummy Candy* ekstrak buah andaliman

Formulasi yang digunakan mengacu penelitian yang digunakan (Zico, 2011) yang dimodifikasi dengan rancangan formula sesuai tabel 1

Tabel 1. Rancangan formula *gummy candy* ekstrak buah andaliman

Nama Bahan	FI (mg)	FII (mg)	FIII (mg)	K (-) I (mg)	K (-) II (mg)	K (-) III (mg)
Ekstrak	1200	1200	1200	-	-	-
Gelatin	575	600	625	575	600	625
Maltodekstrin	135	110	85	135	110	85
Gliserin	400	400	400	400	400	400
Gom arab	20	20	20	20	20	20
Gula Tropical	630	630	630	630	630	630
Metil paraben	3	3	3	3	3	3
Asam sitrat	37	37	37	37	37	37
Aquadest	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Total (g)	4	4	4	4	4	4

Keterangan :

FI : Formula satu *gummy candy* dengan variasi gelatin 80,9 % : maltodekstrin 19,1 %

- FII : Formula dua *gummy candy* dengan variasi gelatin 84,5 % : maltodekstrin 15,5 %
 FIII : Formula tiga *gummy candy* dengan variasi gelatin 88 % : maltodekstrin 12%
 Kontrol (+) : Tetracycline HCl
 Kontrol (-) : Formula *gummy candy* tanpa ekstrak

11. Pembuatan formula sediaan *gummy Candy*

Pembuatan *gummy candy* yang pertama yaitu dengan mengembangkan gelatin menggunakan air panas di atas waterbath (untuk tiap satu *gummy candy* dibutuhkan 1 ml air untuk mengembangkan gelatin sesuai dengan konsentrasinya pada setiap formula), setelah itu di kembangkan gom arab dengan gliserin. Selanjutnya mencampurkan gelatin dengan gom arab dalam gliserin yang telah mengembang tadi kedalam cawan di atas waterbath dengan suhu 60⁰C sambil diaduk hingga homogen, kemudian di tambahkan maltodekstrin dan gula stealaf aduk hingga homogen lalu cawan di tutup menggunakan alumunium foil guna mencegah penguapan air dari pemanasan yang mengakibatkan berkurangnya berat *gummy candy* dan tunggu hingga terbentuk basis *gummy* dengan ditandai larutan bewarna jernih. Setelah itu turunkan cawan lalu tambah ekstrak dalam basis dan aduk hingga homogen, kemudian tambahkan asam sitrat, aduk hingga homogen dan yang terakhir tambahkan metil paraben. Campuran tersebut kemudian dituang kedalam cetakan dan didinginkan hingga terbentuk massa *gummy candies* yang ditandai dengan mengerasnya dan terbentuk tekstur yang kenyal kemudian siap untuk dilakukan uji sifat fisiknya (Zico, 2011).

12. Evaluasi Sediaan *Gummy Candy*

12.1 Uji organoleptik. Pengujian organoleptik diamati menggunakan panca indra terhadap *gummy candy* meliputi pemeriksaan warna, rasa, bau, dan tekstur (Sunaryo *et al.*, 2020).

12.2 Uji kadar air. Menurut menurut SNI No. 3542-2 Tahun 2008 uji kadar air metode oven, pengujian ini dilakukan dengan mengeringkan cawan beserta tutupnya menggunakan oven dengan mengatur pada suhu 100⁰C selama kurang lebih 1 jam dan di dinginkan dalam desikator selama 20-30 menit lalu di timbang cawan beserta tutupnya. Masukkan *gummy gummy* kedalam cawan lalu tutup dan ditimbang. Setelah itu panaskan cawan dalam keadaan terbuka dengan tutup diletakkan disamping cawan di dalam oven pada suhu 100⁰C selama 3 jam. Tutup cawan saat masih di dalam oven dan dinginkan ke

dalam desikator selama 20-30 menit lalu ditimbang. Lakukan pemanasan kembali selama 1 jam dan kembali ulangi sampai sampai berat konstan dengan interval kurang lebih 2 mg, syarat kadar air yaitu maksimal 20%. Rumus perhitungan kadar air :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{Berat sampel} - \text{berat kering}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

12.3 Uji kadar abu. Pengujian ini dilakukan dengan menimbang cawan porselin kosong dan diketahui bobotnya. Masukkan *gummy candy* kedalam cawan porselin dan ditimbang. Sampel dipanaskan diatas bunsen dengan api kecil hingga asapnya hilang, lalu dimasukkan kedalam tanur dengan suhu 500°C hingga abu berwarna putih, didinginkan pada desikator dan kemudian timbang berat cawan hingga bobot tetap (Ramadhany *et al.*, 2020). Syarat kadar abu *gummy candy* menurut No. 3542-2 Tahun 2008 yaitu tidak boleh lebih dari 3%. Rumus perhitungan kadar abu :

$$\% \text{ kadar abu} = \frac{\text{Berat abu}}{\text{berat awal}} \times 100\%$$

12.4 Uji stabilitas. Pengujian dilakukan dengan dengan menyimpan *gummy candy* selama 2 minggu pada suhu sejuk (8°C – 15°C), suhu kamar (15 °C-30°C) dan suhu hangat (30°C - 40°C). Perubahan yang diamati pada ciri fisik seperti aroma, rasa, warna dan kekenyalan (Rashati dan Eryani., 2019).

13. Uji angka lempeng total

13.1 Uji angka lempeng total tanpa perlakuan. Pertama dilakukan dengan mengambil 1,0 mL bakteri kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL aquadest untuk pengenceran pertama dan didapat pengenceran 10⁻¹. Pengenceran 10⁻¹ diambil 1,0 mL lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi berisi 9 mL aquadest sehingga didapat pengenceran 10⁻² dan dilanjutkan dengan dilakukan pengenceran sampai 10⁻⁶. setiap cawan petri ditambah media NA pada di setiap pengenceran dan ditambahkan 1,0 mL bakteri. Goyang-goyang cawan petri sampai merata dan padat. Kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 35 - 37°C. Setelah diinkubasi 24 jam, diamati dan di hitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Syarat jumlah koloni bakteri yaitu kisaran antara 25-250 koloni.

13.2 Uji angka lempeng total dengan perlakuan. Pengujian selanjutnya dengan melarutkan *gummy* dengan memasukkan *gummy* berat 4 gram dalam tabung erlemeyer, 1,0 mL bakteri kemudian

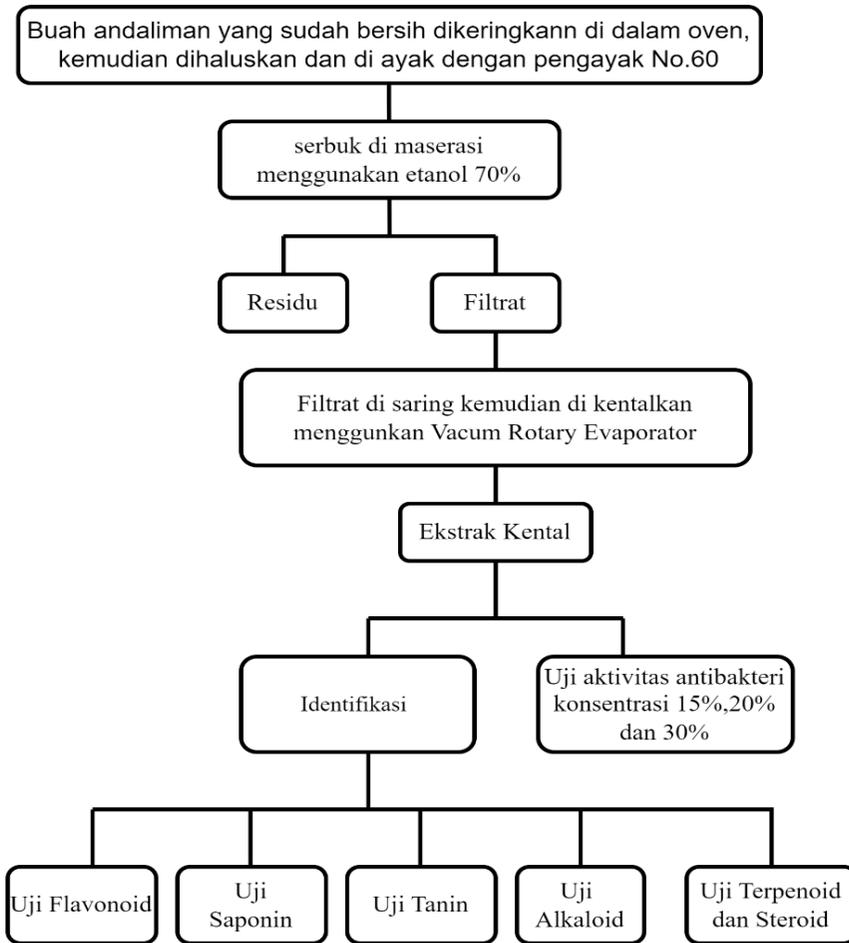
ditambahkan NaCl saliva ad 600 mL tunggu berapa lama *gummy candy* bisa melarut dengan sempurna. Kemudian 1,0 mL sampel dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL aquadest untuk pengenceran pertama dan didapat pengenceran 10^{-1} . Pengenceran 10^{-1} diambil 1,0 mL lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi berisi 9 mL aquadest sehingga didapat pengenceran 10^{-2} dan dilanjutkan dengan dilakukan pengenceran sampai pengenceran 10^{-6} . Setiap cawan petri ditambah media NA pada di setiap pengenceran dan ditambahkan 1,0 mL sampel. Goyang-goyang cawan petri sampai merata dan padat. Kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 35- 37°C. Setelah diinkubasi 24 jam, diamati dan di hitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh.

E. Analisis Hasil

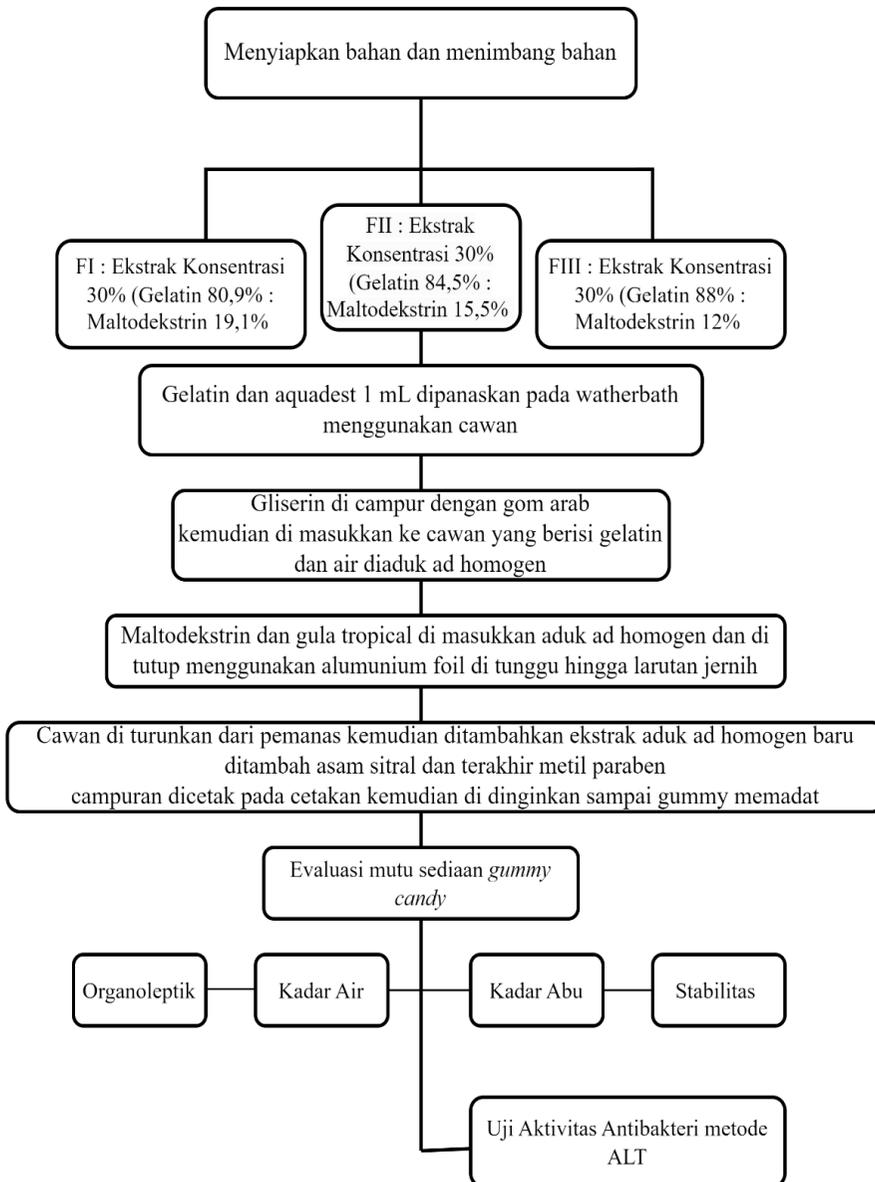
Pengujian dilakukan menggunakan beberapa parameter yaitu uji mutu, stabilitas fisik serta uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram yang dianalisis dengan *SPSS* dengan kepercayaan 95%. Data uji mutu dan stabilitas fisik yang diperoleh dianalisis menggunakan uji normalitas Shapiro Wilks, jika data yang diperoleh terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka diteruskan uji homogenitas *Lavene Test*, jika data yang diperoleh tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka dilanjutkan uji Kruskal-wallis, apabila data dinyatakan normal serta homogen, maka dilanjutkan uji *One Way Anova*.

Data aktivitas antibakteri yang dihasilkan dianalisis menggunakan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro Wilks*, jika data yang diperoleh terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka dilanjutkan uji homogenitas *Lavene Test*, jika data yang diperoleh tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) dilakukan uji *Kruskal-wallis*, jika data dinyatakan normal dan homogen, maka dilakukan uji *One Way Anova*.

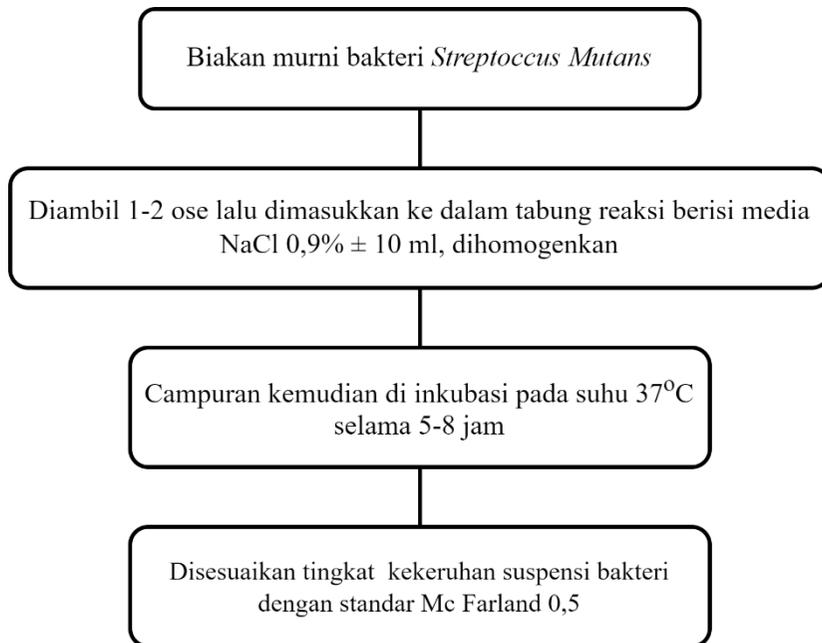
F. Skema Penelitian



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak dan identifikasi senyawa.



Gambar 4. Skema pembuatan formula sediaan dan evaluasi sediaan



Gambar 5. Skema pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus Mutans*