

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan dari subjek penelitian. Populasi yang digunakan untuk objek penelitian ini adalah daun mimba (*Azadirachta indicus* A. Juss) yang diambil dari UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional RSUP Dr. Sardjito berlokasi di Kebun Aromatik Tlogodringo, Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian dari populasi yang ingin diteliti, memiliki ciri-ciri keberadaan populasi. Sampel pada penelitian ini adalah daun mimba (*Azadirachta indicus* A. Juss) yang diambil dengan memilih daun yang berwarna hijau dan tidak ada hama yang menempel pada daun, masih segar dan tidak layu.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama penelitian ini yaitu ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss).

Variabel utama kedua pada penelitian ini yaitu aktivitas antibakteri *Streptococcus mutans* dalam formulasi pasta gigi ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang sudah diidentifikasi dapat dikategorikan kedalam bermacam variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali serta variabel tergantung.

Variabel bebas yang ada pada penelitian ini yaitu variabel yang sengaja diubah-ubah agar dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung.

Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung hingga diperlukan kualifikasi agar hasil yang didapatkan tidak tersebar serta dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Na-CMC dalam formulasi pasta gigi dengan berbagai konsentrasi.

Variabel kendali penelitian ini yaitu kemurnian bakteri uji *Streptococcus mutans*, kondisi laboratorium (meliputi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang dipakai dalam penelitian ini.

Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu diameter daya hambat antibakteri yang dapat dilihat dari pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada media uji.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) adalah daun yang sedang (tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua) berwarna hijau dan tidak ada hama yang menempel pada daun, masih segar dan tidak layu didapat dari UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional RSUP Dr. Sardjito berlokasi di Kebun Aromatik Tlogodringo, Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) adalah daun yang sedang yang diambil lalu dicuci dengan air mengalir agar kotoran yang menempel hilang, setelah itu dikeringkan menggunakan oven sampai mengering, setelah kering dijadikan serbuk serta ayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, formulasi adalah sediaan pasta gigi dari ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)

Keempat, evaluasi mutu sediaan pasta gigi adalah uji organoleptik, uji homogenitas, uji pH, uji busa, uji viskositas dan uji stabilitas.

Kelima, bakteri uji pada penelitian ini yaitu *Streptococcus mutans* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keenam, uji aktivitas antibakteri ialah uji menggunakan metode difusi. Metode difusi berupa sediaan dalam berbagai formula pasta gigi dengan konsentrasi Na-CMC yaitu 1%, 2%, 3%, dan control positif berupa pasta gigi pasaran "P".

Ketujuh, diameter zona hambat merupakan zona bening yang terbentuk disekitar cakram karena terdapat pertumbuhan bakteri uji dihambat oleh sampel uji.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, evaporator, cawan petri, autoclaf, oven, inkubator, tabung erlenmayer, botol bermulut lebar berwarna gelap, sudip, gelas untuk menyimpan ekstrak, timbangan, ayakan no 40, mortir dan stamper, beaker glass, batang pengaduk, pipet ukur, gelas ukur, pot obat, bunsen, jarum ose, pinset, jangka sorong, alat daya sebar, alat uji pH, sarung tangan, rak tabung, enkas, *Rotary Vacum Evaporator*, viskometer *Brookfield*, waterbath, wadah, pisau, cawan petri (Echa, 2019).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) yang diperoleh dari UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional RSUP Dr. Sardjito berlokasi di Kebun Aromatik Tlogodringo, Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah, kalsium karbonat, gliserin, natrium karboksimetil selulosa, natrium laurel sulfat, sorbitol, metil paraben, minyak permen, air suling, etanol 70% media MHA (*Mueller Hinton Agar*), aquadest, biakan *Streptococcus mutans* yang diambil di Universitas Setia Budi Surakarta (Echa, 2019).

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan Bahan

Sampel daun mimba dipilih yang masih segar, berwarna hijau, tidak busuk, serta terbebas dari hama yang diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Determinasi Tanaman

Tanaman yang digunakan dalam penelitian, yaitu tanaman daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss). Tanamannya mimba ini diambil di UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional RSUP Dr. Sardjito berlokasi di Kebun Aromatik Tlogodringo, Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah. Fungsi analisis dan pengujian yang terbukti di laboratorium untuk mengetahui keberadaan ciri-ciri morfologi tanaman daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss).

Sampel daun mimba dipilih yang masih segar, berwarna hijau, tidak busuk, serta terbebas dari hama yang diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

3. Pembuatan Serbuk

Proses penyiapan simplisia dimulai dengan sortasi basah, dilanjutkan dengan pencucian, perajangan, dan pengeringan di bawah

sinar matahari selama sekitar satu minggu. Selama pengeringan, bahan ditutup menggunakan kain hitam. Setelah kering, dilakukan sortasi kering. Selanjutnya, sampel digiling menggunakan alat glinder hingga menjadi serbuk, lalu disaring dengan ayakan nomor 40 untuk memperoleh serbuk yang halus dan seragam (Desi et al., 2021).

3.1 Penetapan Susut Pengeringan. Pengujian susut pengeringan serbuk dilakukan menggunakan alat *moisture balance* dengan tujuan untuk mengetahui seberapa besar kandungan senyawa yang menguap selama proses pengeringan. Prosedur penggunaannya dimulai dengan menyalakan alat, lalu mengatur suhu pada 105°C. Sebanyak 2 gram serbuk ditimbang langsung di dalam alat, kemudian alat ditutup rapat dan dibiarkan hingga kadar susut pengeringan serbuk daun mimba mencapai nilai yang stabil. Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali ulangan (Dewi, 2019).

3.2 Pengujian Kadar Air. Pengujian kadar air bertujuan untuk mengetahui persentase kandungan air dalam serbuk maupun ekstrak. Salah satu metode yang digunakan adalah metode Sterling Bidwell. Prosedurnya dimulai dengan menimbang sampel, lalu memasukkannya ke dalam labu didih dan menambahkan pelarut sebanyak 200 ml, seperti toluena atau xilena. Labu kemudian dihubungkan dengan alat Sterling Bidwell serta kondensor. Pemanasan dilakukan secara hati-hati selama 15 menit, dan setelah sampel mulai menggelembung, kecepatan penyulingan diatur sekitar 2 tetes per detik. Setelah semua air berhasil tersuling, bagian dalam kondensor dicuci menggunakan toluena jenuh air. Volume air yang terkumpul kemudian dibaca setelah pemisahan antara air dan toluena berlangsung sempurna. Kadar air dihitung dalam persen volume terhadap bobot (% v/b) (Depkes RI, 2017).

4. Pembuatan Ekstrak Daun Mimba

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, di mana ekstrak diperoleh dengan mengekstrak serbuk kering simplisia menggunakan pelarut yang sesuai, yang mampu melarutkan sebagian besar metabolit sekundernya. Sebanyak 500 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam alat maserator, lalu ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 10 kali lipat dari berat serbuk, yaitu 5 liter. Perendaman dilakukan selama 6 jam sambil diaduk sesekali, kemudian campuran disimpan selama 18 jam. Setelah itu, larutan maserat dipisahkan melalui proses filtrasi. Untuk memastikan ekstraksi maksimal, proses ini

diulangi sekali lagi dengan pelarut yang sama, namun menggunakan setengah volume sebelumnya, yaitu 2,5 liter etanol 96%. Hasil ekstraksi kemudian diuapkan menggunakan alat penguap vakum atau tekanan rendah seperti *rotavapor*, hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen diekspresikan dalam persen berat terhadap berat serbuk awal (b/b) dan dibandingkan dengan standar yang tercantum dalam monografi ekstrak (Kemenkes RI, 2017).

5. Penetapan Sifat Ekstrak

5.1 Pemeriksaan Organoleptis. Uji organoleptik dilakukan untuk mengamati karakteristik fisik seperti aroma, warna, dan rasa dari sediaan serbuk maupun ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) (Nabila, 2023).

6. Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Daun Mimba

Uji pendahuluan dilakukan untuk memperoleh gambaran awal mengenai kandungan kimia dalam daun mimba, khususnya untuk mendeteksi keberadaan gugus kromofor dalam senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak (Lilies, 2012).

6.1 Identifikasi Alkaloid. Sebanyak 2 ml larutan uji dipanaskan hingga menguap dalam cawan porselen. Residu yang tertinggal kemudian dilarutkan menggunakan 5 ml larutan HCl 2N, lalu didinginkan dan disaring. Setelah itu, ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff. Jika terbentuk endapan berwarna jingga kecoklatan, maka hasilnya menunjukkan adanya kandungan alkaloid (Marliana et al., 2005).

6.2 Identifikasi Flavonoid. Sebanyak 1 ml larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan dengan beberapa tetes NaOH 20%. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna kuning (Ugochukwu et al., 2013).

6.3 Identifikasi Tanin. Sebanyak 2 ml larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna hitam kehijauan atau hitam (Nirwana et al., 2015).

6.4 Identifikasi Saponin. Sebanyak 5 ml larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi tambahkan 5 ml aquadest panas dan dikocok 30 detik, apabila terbentuk busa selama 10 menit setinggi 1-10 cm dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCl 2N, maka teridentifikasi adanya saponin (Marliana et al., 2005).

6.5 Identifikasi Antraquinon. Sebanyak 5 ml larutan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi tambahkan beberapa tetes natrium hidroksida 1N. Adanya senyawa antraquinon ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna merah (Nirwana *et al.*, 2015).

6.6 Identifikasi Steroid dan Triterpenoid. Larutan uji sebanyak 2 ml diuapkan . Residu yang diperoleh dilarutkan dalam 2 ml kloroform, lalu ditambah pereaksi liebermann-burchard melalui dinding tabung tersebut. Terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya sterol jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan/violet pada perbatasan 2 pelarut, menunjukkan adanya triterpenoid (Jones dan Kinghom, 2006).

7. Formula Pasta Gigi Ekstrak Daun Mimba

Langkah pertama adalah menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan. Natrium karboksimetil selulosa (Na-CMC) dilarutkan dalam air mendidih, kemudian didiamkan selama 30 menit. Setelah itu, campuran digerus hingga terbentuk basis gel pertama (massa I). Selanjutnya, kalsium karbonat digerus bersama gliserin dan sorbitol hingga membentuk campuran gel (massa II). Massa II kemudian dicampurkan dengan ekstrak daun murbei dan digerus hingga tercampur merata. Setelah agak basah, campuran tersebut ditambahkan ke dalam massa I dan digerus kembali hingga homogen, menghasilkan massa III. Sakarin natrium dilarutkan dalam aquadest, lalu ditambahkan ke dalam massa III dan digerus hingga tercampur rata (massa IV). Methylparaben dan propylparaben dilarutkan dalam sisa air panas, diaduk hingga merata, lalu campuran ini ditambahkan ke massa IV dan digerus kembali hingga homogen. Terakhir, natrium lauril sulfat ditambahkan dan diaduk perlahan hingga pasta terbentuk secara merata dan mengembang. Pasta gigi yang telah jadi kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang sesuai (Marlina & Rosalini, 2018).

Tabel 1. Rancangan Formula Pasta Gigi Ekstrak Daun Mimba

Bahan	Formula (% b/v)			
	F1	F2	F3	F4
Ekstrak daun mimba	1	1	1	-
Kalsium karbonat	40	40	40	40
Gliserin	15	15	15	15
Na-CMC	1	2	3	1
Natrium lauril sulfat	2	2	2	2
Sorbitol	0,1	0,1	0,1	0,1
Metil paraben	0,1	0,1	0,1	0,1
Minyak peppermint	1	1	1	1
Aquades hingga	100	100	100	100

Keterangan :

F1 = Formula 1 pasta gigi dengan konsentrasi Na-CMC 1%

F2 = Formula 2 pasta gigi dengan konsentrasi Na-CMC 2%

F3 = Formula 3 pasta gigi dengan konsentrasi Na-CMC 3%

F4 = Formula 4 kontrol negatif (sediaan pasta gigi tanpa ekstrak) dengan konsentrasi Na-CMC 1%

K+ = Kontrol positif menggunakan pasta gigi merk P

8. Pembuatan Sediaan Pasta Gigi Ekstrak Daun Mimba

Langkah pertama dimulai dengan menyiapkan alat dan bahan sesuai kebutuhan, serta menimbang semua bahan berdasarkan formula yang tercantum dalam tabel komposisi pasta gigi. Natrium karboksimetil selulosa (Na-CMC) dilarutkan dalam air panas menggunakan mortar yang telah dihangatkan. Selanjutnya, metil paraben ditambahkan ke dalam larutan tersebut sambil diaduk hingga tercampur secara merata. Kemudian, kalsium karbonat dilarutkan dalam akuades di mortar yang berbeda, dan larutan Na-CMC ditambahkan secara bertahap sambil digerus hingga membentuk basis pasta yang homogen. Ekstrak daun mimba dilarutkan terlebih dahulu dalam akuades hingga larut sempurna. Setelah itu, gliserin, minyak peppermint, dan larutan ekstrak daun mimba dicampurkan ke dalam basis pasta, lalu diaduk hingga merata. Terakhir, natrium lauril sulfat ditambahkan sebagai agen pembusa untuk menghasilkan busa saat digunakan (Echa, 2019).

9. Pengujian Mutu Fisik Sediaan Pasta Gigi

9.1 Uji Organoleptik, Pengujian organoleptik adalah pengujian yang didasari pada penginderaan. Pengujian organoleptik dapat dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, bau dan rasa (Marlina & Rosalini, 2018).

9.2 Uji Homogenitas, Pasta yang akan diuji Oleskan hingga 100 mg pasta yang akan diuji pada objek glass dan amati homogenitasnya. Jika tidak terdapat butiran pada objek glass, maka pasta gigi memenuhi syarat uji homogenitas (Marlina & Rosalini, 2018).

9.3 Uji Penentuan pH, Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH universal. Sebanyak 1 gram pasta gigi diencerkan dengan aquadest hingga 100 ml. Dimasukkan stik pH universal dalam larutan pasta gigi yang sudah dibuat. pH sediaan harus sesuai dengan standar SNI yaitu 4,5-11,0 (SNI, 2016).

9.4 Uji Viskositas, Pengukuran kekentalan dilakukan menggunakan alat viskometer Brookfield. Spindel dimasukkan ke dalam sampel hingga mencapai kedalaman tertentu yang telah ditentukan.

Setelah alat dinyalakan, arus listrik akan memutar spindel, dan viskositas akan terbaca pada layar viskometer. Alat ini dilengkapi dengan empat jenis spindel logam yang dapat disesuaikan dengan tingkat kekentalan bahan yang akan diukur. Nilai viskositas yang diperoleh ditampilkan dalam satuan centipoise (cP), dan pengukuran dilakukan pada suhu ruang. Rentang standar viskositas yang diharapkan adalah antara 20.000 hingga 50.000 cP (Marlina & Rosalini, 2018).

9.5 Uji Pembentukan Busa, Sebanyak 1 g sampel ditempatkan dalam gelas ukur, lalu ditambahkan aquadest hingga volumenya mencapai 10 ml. Setelah gelas ukur ditutup dengan aluminium foil, sampel dikocok selama 20 menit dan dibiarkan selama 5 menit. Setelah itu, tinggi busa yang terbentuk diukur menggunakan mistar. Untuk pasta gigi, tinggi busa maksimum yang diharapkan adalah 15 mm (Marlina, 2017).

9.6 Uji Daya Sebar, Pengujian daya sebar dilakukan dengan menimbang 0,5 g pasta gigi dan meletakkannya di atas kaca berukuran 20x20 cm. Sebuah kaca kedua ditempatkan di atasnya, kemudian ditambahkan 125 g beban tambahan dan dibiarkan selama 1 menit. Setelah itu, diameter dari area yang terbentuk diukur. Daya sebar yang baik untuk pasta gigi berkisar antara 5-7 cm, menunjukkan bahwa konsistensi semisolid yang dihasilkan nyaman untuk digunakan (Syurgana, 2017).

9.7 Uji Stabilitas Sediaan. Pengujian stabilitas sediaan bertujuan untuk memeriksa kondisi fisik (seperti bau, warna, dan kejernihan) serta mengevaluasi pH selama proses penyimpanan. Pemeriksaan stabilitas dilakukan menggunakan metode *cycling test*. Evaluasi sediaan pasta gigi melibatkan uji stabilitas yang dipercepat (*cycling test*) dengan metode *heating-cooling stress*. Proses ini dilakukan selama 12 hari dengan suhu penyimpanan $45 \pm 0,5$ °C dan $4 \pm 0,5$ °C yang bergantian setiap 24 jam. Setelah itu, dilakukan pengamatan terhadap organoleptis, homogenitas, kemampuan menyebar, pH, dan daya busa (Nabila, 2023).

10. Sterilisasi

Setelah digunakan, semua peralatan harus dicuci dan dikeringkan dengan baik. Alat gelas yang tidak tahan panas dibungkus dengan koran dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Sementara itu, alat gelas yang tahan panas disterilisasi dalam oven selama 60 menit. Bahan yang terbuat dari karet disterilisasi dengan

merendamnya dalam etanol 70%. Jarum ose disterilkan dengan cara dipanaskan menggunakan lampu spiritus (Pratiwi, 2008).

11. Identifikasi Bakteri *Streptococcus mutans*

11.1 Identifikasi Dengan Media Agar Darah. Identifikasi menggunakan media bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah *Streptococcus mutans*. Biakan murni *Streptococcus mutans* dioleskan pada media *Blood Agar Plate* (BAP) dengan menggunakan kapas lidi steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil positif dapat dilihat apabila terbentuk warna abu-abu kehijauan di sekitar koloni, yang menunjukkan adanya hemolisis alfa. Pembuatan BAP dilakukan dengan melarutkan 8 gram serbuk *Blood Agar* ke dalam 200 ml akuades, kemudian dipanaskan hingga homogen. Selanjutnya, media tersebut ditutup dengan kapas dan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses tersebut, 16 ml darah ditambahkan dan dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri steril hingga mencapai 15 ml, lalu dibiarkan hingga memadat sebelum digunakan (Jawetz et al., 2007).

11.2 Identifikasi Dengan Pengecatan Gram. Pewarnaan Gram pada bakteri bertujuan untuk mengidentifikasi apakah bakteri tersebut termasuk Gram negatif atau Gram positif. Pengujian ini dilakukan dengan menyiapkan bahan seperti jarum ose, bakteri, dan kaca objek. Sterilkan tabung dengan api bunsen hingga jarum ose menyala merah, kemudian angin-anginkan sebentar di dekat api untuk menjaga sterilisasi. Tabung tersebut digunakan untuk menampung dan mendistribusikan bakteri secara merata pada kaca objek yang sudah disterilkan menggunakan etanol 70%. Setelah itu, bakteri di permukaan kaca objek dibasahi dengan satu tetes air suling, lalu disterilkan kembali dengan api bunsen. Proses pewarnaan dimulai dengan menambahkan satu tetes larutan Gram A (crystal violet) dan dibiarkan selama satu menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya, tambahkan satu tetes larutan Gram B (Lugol's iodine) selama satu menit dan bilas kembali. Setelah itu, teteskan larutan Gram C (alkohol 70%) hingga warna menghilang, kemudian tambahkan larutan Gram D (safranin) dan biarkan mengering di sekitar bakteri sebelum diamati di bawah mikroskop. Kaca objek yang berisi bakteri dicelupkan ke dalam larutan imersi untuk meningkatkan kejernihan gambar dan menghindari gangguan indeks bias. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 1000x. Bakteri Gram positif akan tampak berwarna ungu,

sedangkan bakteri Gram negatif akan tampak berwarna merah muda (Jawetz et al., 2007).

11.3 Identifikasi Dengan Biokimia. I Identifikasi biokimia terdiri dari pengujian katalase dan koagulase. Uji katalase dilakukan dengan cara menyiapkan tabung reaksi yang diisi media BHI, diinokulasi dengan suspensi bakteri, kemudian ditambahkan H₂O₂ (hidrogen peroksida) 3%. *Streptococcus mutans* Identifikasi bakteri katalase menunjukkan hasil positif jika terdapat gelembung udara di dalam tabung reaksi. Uji koagulase dilakukan dengan menempatkan 200 µl plasma sitrat secara aseptik ke dalam tabung reaksi steril. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes suspensi bakteri uji ke dalam tabung lalu aduk. Tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati setelah 4 jam pertama dan 18-24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya bekuan plasma di dasar tabung reaksi (Jawetz et al. 2007).

12. Peremajaan Bakteri

Koloni *Streptococcus mutans* diambil menggunakan jarum ose, kemudian dioleskan pada media *Nutrient Agar* (NA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Pratiwi, 2008). Nutrient Agar disiapkan dengan melarutkan 2,8 gram NA dalam 100 ml akuades, lalu dipanaskan menggunakan penangas air hingga larut, dan kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah disterilkan, media ini disimpan dalam lemari pendingin untuk digunakan dalam pembiakan dan pertumbuhan bakteri (Afni, 2015).

13. Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus mutans*

Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan dengan mengambil satu ose biakan murni, kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, biakan diambil menggunakan jarum ose steril dan disuspensikan ke dalam 2 ml larutan NaCl 0,9% (yang dibuat dengan melarutkan 0,18 gram NaCl dalam 20 ml air). Konsentrasi suspensi bakteri kemudian disesuaikan dengan standar McFarland 0,5, yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, untuk menjamin jumlah bakteri yang konsisten. Media BHI disiapkan dengan cara melarutkan 3,7 gram serbuk BHI dalam 100 ml aquades, dipanaskan hingga larut sempurna, lalu ditutup menggunakan kapas dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Desi et al., 2021).

14. Pembuatan Medium MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Medium *Mueller Hinton Agar* (MHA) disiapkan dengan menimbang sebanyak 3,8 gram serbuk MHA dan melarutkannya dalam 100 ml aquades. Campuran tersebut kemudian dipanaskan menggunakan penangas air sambil diaduk secara terus-menerus agar tidak menggumpal, hingga larutan mencapai titik didih. Setelah larut sempurna, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi, media dituangkan secara aseptis ke dalam cawan Petri steril dan dibiarkan hingga memadat pada suhu ruang. Media yang telah memadat disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C hingga siap digunakan (Utomo et al., 2018).

15. Pengujian Antibakteri Sediaan Pasta Gigi

Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram kertas dengan medium *Mueller Hinton Agar* (MHA). Media MHA yang telah disterilkan didinginkan hingga mencapai suhu sekitar 45°C, kemudian dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak 15 ml, lalu dibiarkan hingga memadat. Setelah media memadat, suspensi bakteri *Streptococcus mutans* yang telah disesuaikan dengan standar kekeruhan Mc.Farland 0,5 dioleskan merata ke seluruh permukaan media, kemudian dibiarkan agar bakteri menyerap dan menyebar ke dalam media (Echa, 2019).

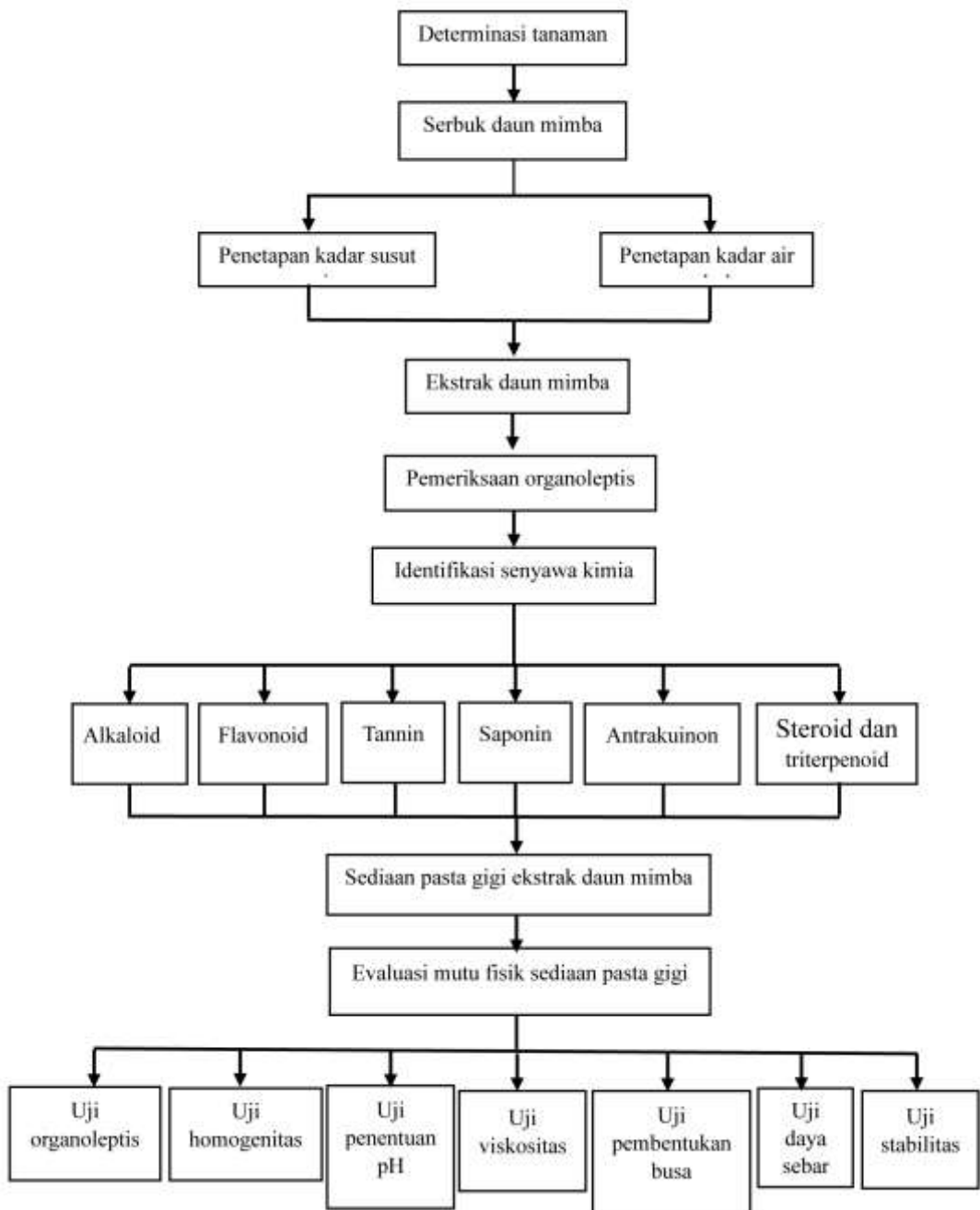
Lima buah cakram kertas digunakan untuk pengujian, masing-masing direndam dalam sediaan pasta gigi berbahan ekstrak daun mimba sesuai dengan formula yang diuji. Cakram pertama hingga keempat masing-masing mengandung formula 1 sampai formula 4 sebagai kontrol negatif, sedangkan cakram kelima berisi formula 5 sebagai kontrol positif. Seluruh cakram direndam dalam sediaan selama 15 menit, lalu diletakkan di atas permukaan media yang telah diinokulasi menggunakan pinset steril.

Cawan petri kemudian diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengamatan terhadap zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram kertas. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan untuk menilai efektivitas antibakteri dari masing-masing formulasi. Setiap perlakuan diuji ulang sebanyak tiga kali untuk memastikan validitas hasil (Widiya et al., 2017).

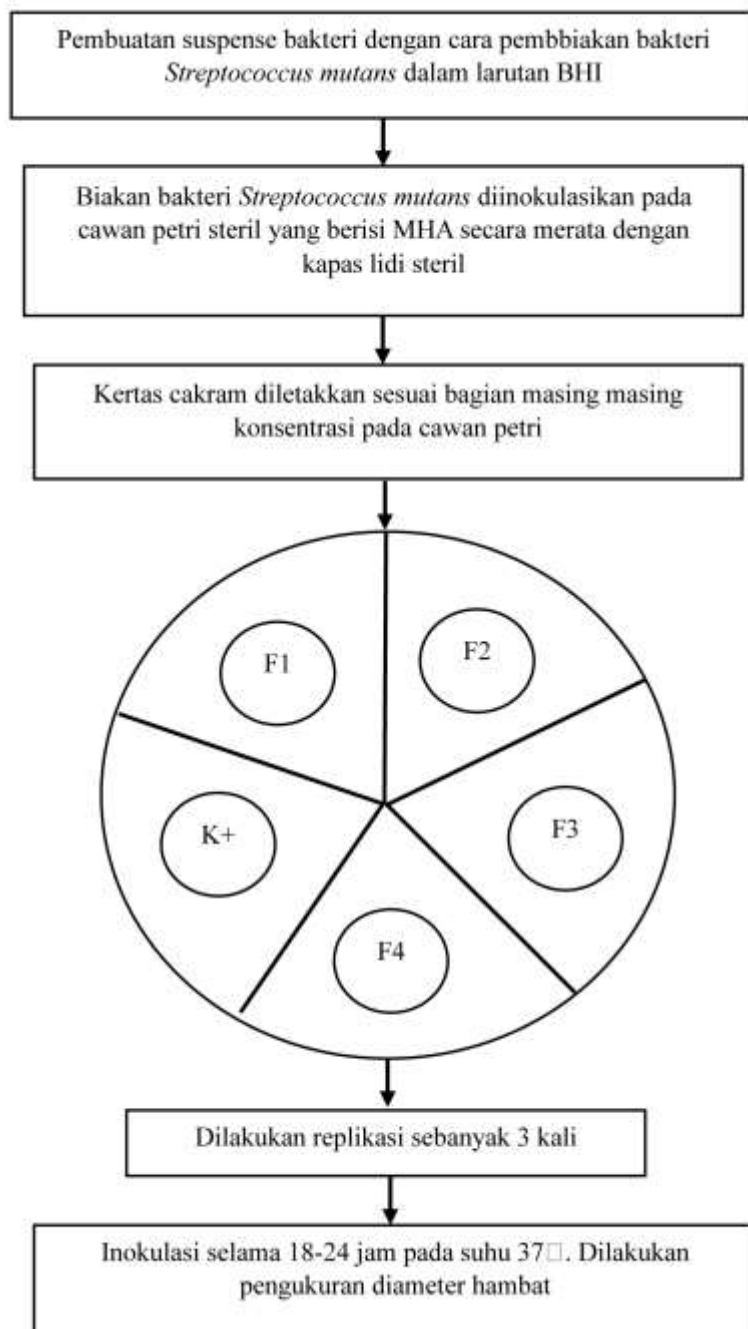
E. Analisis Hasil

Analisis hasil dari berbagai pengujian parameter seperti pH, viskositas, tinggi busa, daya sebar, dan uji difusi dilakukan dengan membandingkan hasil yang diperoleh dari berbagai literatur menggunakan SPSS. Data dianalisis dengan *Kolmogorov-Smirnov*, jika terdistribusi normal ($p > 0,05$), analisis dilanjutkan dengan *ANOVA One Way* untuk menguji signifikansi stabilitas sediaan dengan tingkat kepercayaan 95%. Selanjutnya, pengujian *Tukey* dilakukan untuk mengetahui konsentrasi yang berpengaruh sama atau berbeda. Jika hasil tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis*, kemudian diikuti dengan pengujian *Mann Whitney* untuk menentukan konsentrasi yang memiliki pengaruh yang sama atau berbeda.

F. Skema penelitian



Gambar 4. Skema penelitian



Keterangan :

(F1) formula pasta gigi dengan konsentrasi Na-CMC 1%, (F2) formula pasta gigi dengan konsentrasi Na-CMC 2%, (F3) formula pasta gigi dengan konsentrasi Na-CMC 3%, (F4) formula pasta gigi dengan konsentrasi Na-CMC 1% tanpa ekstrak daun mimba, dan (K+) control positif pasta gigi merk Pepsodent herbal.