

BAB III

METODE DAN PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah seluruh obyek sebagai target penelitian populasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu sediaan obat kumur ekstrak buah apel manalagi (*Pyrus malus var. sylvestris* L.) yang diperoleh dari Kota Batu, Malang, Jawa Timur pada bulan Januari.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian dari keseluruhan karakteristik dari sebuah populasi yang hendak diteliti. Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu sediaan obat kumur ekstrak buah apel manalagi (*Pyrus malus var. sylvestris* L.) dengan variasi konsentrasi gliserin.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah ekstrak buah apel manalagi (*Pyrus malus var. sylvestris* L.) pada sediaan obat kumur.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah mutu fisik, stabilitas dan aktivitas antibakteri obat kumur ekstrak buah apel manalagi (*Pyrus malus var. sylvestris* L.) terhadap *S. mutans* ATCC 25175.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang sudah diidentifikasi dapat dikategorikan dengan berbagai macam variabel antara lain variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel terikat. Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau timbulnya variabel yang terikat. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu variasi konsentrasi gliserin sebagai humektan pada sediaan obat kumur ekstrak buah apel manalagi.

Variabel terikat adalah variabel yang dimana menjadi titik pusat masalah yang menjadi kriteria dalam penelitian ini. Pada penelitian ini variabel terikat yang dimaksud, yaitu mutu fisik seperti uji organoleptik, viskositas, pH, stabilitas obat kumur ekstrak buah apel manalagi (*Pyrus malus var. sylvestris* L.) diameter zona hambat dari obat kumur ekstrak buah apel manalagi terhadap *S. mutans*.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang memiliki kemampuan untuk mempengaruhi variabel terikat yang ditetapkan agar hasil yang diperoleh tidak mudah tersebar serta peneliti mampu mengulang secara akurat. Pada penelitian ini variabel terkontrol yang dimaksud adalah kondisi fisik peneliti, kondisi laboratorium, cara pembuatan, waktu pembuatan, waktu inkubasi, suhu inkubasi, media tanam yang akan digunakan, bakteri *S. mutans*.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, buah apel manalagi dari tanaman apel yang berwarna hijau kemerahan, bersih, tidak busuk, terbebas dari hama dan buah apel yang memiliki umur panen berumur 4,5-5 bulan (Muchlisun, 2015).

Kedua, serbuk buah apel manalagi adalah serbuk yang didapat dari buah apel manalagi yang telah dicuci bersih menggunakan air mengalir dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C, kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak buah apel manalagi merupakan hasil ekstraksi dari serbuk buah apel manalagi dengan larutan penyari etanol 70% menggunakan metode maserasi.

Keempat, maserasi atau proses ekstraksi simplisia yang menggunakan pelarut etanol 70% dengan penggojogan atau pengadukan yang dilakukan beberapa kali pada suhu ruang atau kamar 20-25 °C.

Kelima, evaluasi mutu fisik sebagai tolak ukur yang digunakan untuk mengetahui stabilitas dari sediaan obat kumur melalui uji organoleptik, pH, viskositas, dan stabilitas.

Keenam, bakteri uji dalam penelitian ini menggunakan bakteri *S. mutans* ATCC 25175 yang didapat dari laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketujuh, diameter zona hambat merupakan daerah sekeliling cakram disk yang tidak ditemukan pertumbuhan bakteri *S. mutans* yang berisi sediaan obat kumur yang diujikan.

Kedelapan, metode uji yang digunakan pada penelitian ini adalah metode difusi cakram. Cara membuat metode ini dengan media yang ditanami mikroorganisme lalu pada cakram kertas dicelupkan agen antibakteri yang akan diuji.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Pada penelitian ini menggunakan alat-alat seperti gelas ukur, beaker glass, Erlenmeyer, tabung reaksi, corong, batang pengaduk, botol, botol mulut besar, botol coklat maserasi, pipet tetes, pisau, ayakan, kertas saring, kain flanel, Bunsen, *water bath*, kurs porselen, *rotary evaporator*, inkubator, *autoclave*, oven, penggilingan, viskometer, *centrifuge*, pH meter, neraca analitik, perforator, jangka sorong, jarum ose, *Laminator Air Flow (LAF)*, mikropipet, *object glass*, *deck glass*, cawan petri, mikroskop.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Pada penelitian ini bahan sampel yang akan digunakan adalah buah apel manalagi yang berwarna hijau kemerahan, bersih, tidak busuk, dan terbebas dari hama atau penyakit.

2.2 Bahan kimia. Pada penelitian ini bahan kimia yang akan digunakan adalah sodium sakarin, natrium benzoat, *oleum menthae*, tween 80, etanol 70%, *aqua destilata*, spiritus, NaCl, reagen Mayer, reagen Dragendorff, reagen Wanger, serbuk magnesium, H₂SO₄ pekat, asam klorida, larutan ninhidrin, FeCl₃, MHA, *crystal violet*, lugol, aseton, safranin.

2.3 Bakteri yang akan digunakan. Pada penelitian ini bakteri yang akan digunakan adalah bakteri *S. mutans* ATCC 25175.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman apel manalagi

Pada tahap awal penelitian dilakukan determinasi tanaman guna mengetahui aktualitas tanaman mengenai morfologi dan ciri-ciri yang terdapat pada tanaman apel manalagi selaras dengan keputusan dan dibuktikan di Laboratorium Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Sampel buah apel manalagi menggunakan buah yang masih segar, dengan warna hijau kemerahan, bersih, tidak busuk, dan terbebas dari penyakit dan hama. Buah apel manalagi. Pada penelitian ini buah apel manalagi yang digunakan berumur 4,5-5 bulan yang diperoleh dari Kota Batu, Malang Jawa Timur.

3. Preparasi sampel

Sampel buah apel manalagi dipilih yang masih segar sesuai dengan ciri-ciri di atas, selanjutnya buah apel manalagi dilakukan

sortasi basah, dibersihkan, diiris tipis, kemudian dikeringkan oven pada suhu 50°C dan dilakukan sortasi kering.

4. Identifikasi serbuk buah apel manalagi (*Pyrus malus* var. *sylvestris* L.)

4.1 Penetapan organoleptik. Pemeriksaan yang telah dilakukan dengan panca indera. Pemeriksaan organoleptik meliputi bentuk, bau, warna, dan rasa dari serbuk buah apel manalagi (*Pyrus malus* var. *sylvestris* L.).

4.2 Penetapan susut pengeringan serbuk. Penetapan susut pengeringan serbuk simplisia buah apel manalagi dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Alat dinyalakan kemudian suhu diatur menjadi 105°C, serbuk buah apel manalagi ditimbang sebanyak 2 gram secara langsung pada alat *moisture balance*, kemudian alat ditutup dengan rapat lalu tunggu sampai diperoleh besarnya kadar kelembaban yang konstan dari serbuk buah apel manalagi. Lakukan replikasi sebanyak tiga kali (Depkes, 2000).

4.3 Penetapan kadar air serbuk. Penetapan kadar air serbuk buah apel manalagi dilakukan dengan membersihkan tabung penerima dengan asam pencuci, bilas menggunakan air, pengeringan dilakukan dalam lemari pengering. Masukkan sejumlah zat yang telah ditimbang ke dalam labu kering. Masukkan 200 ml toluen yang telah dijenuhkan dengan 20 ml air ke dalam labu, lalu hubungkan alat. Toluene dituang dalam tabung penerima melalui alat pendingin. Panaskan labu dilakukan dalam 15 menit. Setelah terjadi pemisahan yang sempurna antara toluen dan air, dilakukan pembacaan volume air. Hitung kadar air dalam % (Rivai *et al.*, 2014).

5. Identifikasi ekstrak buah apel mana lagi (*Pyrus malus* var. *sylvestris* L.)

5.1 Pemeriksaan organoleptik. Pemeriksaan organoleptik dilakukan secara visual tanpa menggunakan alat. Pemeriksaan yang dilakukan meliputi bau, warna, bentuk fisik dari ekstrak buah apel manalagi (*Pyrus malus* var. *sylvestris* L.).

5.2 Penetapan kadar air ekstrak. Pemeriksaan kadar air ekstrak buah apel manalagi menggunakan metode gravimetri. Ekstrak ditimbang sebanyak 10 gram, selanjutnya masukkan ke dalam wadah yang telah ditara. Oven pada suhu 105°C selama 5 jam, kemudian dilakukan penimbangan. Lanjutkan pengeringan (oven) dan selang waktu 1 jam dilakukan penimbangan kembali hingga diperoleh

perbedaan bobot antara dua penimbangan berturut-turut dengan persentase tidak lebih dari 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

5.3 Pengujian bebas etanol. Uji bebas etanol dilakukan guna memastikan bahwa pada ekstrak tidak ada kandungan etanol, menghindari kesalahan apakah bakteri mati atau terhenti karena kandungan kimia ekstrak atau etanol yang ada dalam proses ekstraksi. Pengujian bebas etanol dilakukan dengan esterifikasi etanol yaitu ekstrak ditambahkan asam sulfat dan asam asetat, selanjutnya dipanaskan, apabila ester tidak berbau maka sudah tidak ada etanol (Depkes RI, 1986).

6. Pembuatan serbuk buah apel manalagi

Sampel yang kering dan sudah dilakukan sortasi kering dihaluskan menggunakan blender atau dengan cara digiling, selanjutnya dilakukan pengayakan menggunakan pengayak No.40 sampai diperoleh serbuk halus dan homogen. Pembuatan ekstrak buah apel manalagi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Serbuk buah apel manalagi sebanyak 1000 gram kemudian dilakukan proses maserasi dengan pelarut sebanyak 10 bagian. Serbuk buah apel manalagi dimasukkan kedalam bejana lalu ditambahkan etanol 70% kemudian direndam dan ditutup dengan rapat serta tidak terkena cahaya matahari secara langsung selama 6 jam pertama sambil sesekali di gojok kemudian didiamkan selama 18 jam kemudian maserat dilakukan penyaringan dengan cara filtrasi menggunakan kain flanel. Kemudian lakukan kembali ulangi teknik penyarian dengan jenis pelarut yang sama dan dengan jumlah volume pelarut setengah dari bagian volume pelarut pertama, penyaringan dilakukan menggunakan kertas saring. Maserat yang telah terkumpul dengan menggunakan alat *rotary evaporator* diuapkan pada suhu 40-50°C, kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu kurang dari 40°C selama 12 jam sampai didapat ekstrak kental. Hitung rendemen yang didapat, persentase bobot (b/b) antara bobot rendemen yang diperoleh dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan sesuai penimbangan. Besarnya persentase rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya pada syarat standar yang ditetapkan sesuai dengan monografi ekstrak tanaman tersebut (Kemenkes RI, 2017).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (gram)}}{\text{Bobot simplisia (gram)}} \times 100\%$$

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak

Identifikasi berdasarkan kandungan senyawa kimia dilakukan sebagaimana untuk menguatkan kebenaran terdapatnya zat kimia yang terkandung di dalam ekstrak buah apel manalagi dengan menggunakan metode uji tabung. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa polifenol (katekin, asam klorogenik, dan kuersetin), tannin, saponin, alkaloid dan flavonoid.

7.1 Flavonoid. Ditimbang 1 gram ekstrak lalu dilarutkan pada 20 ml air panas lalu didinginkan dan saring. Sebanyak 5 ml filtrat di masukkan dalam tabung reaksi dan dilakukan penambahan 5 tetes H_2SO_4 pekat. Sampel mengandung senyawa flavonoid akan membentuk warna merah (Sangi, 2008).

7.2 Polifenol. Diambil 2 ml sampel ekstrak kemudian ditambahkan 8 ml aquadest hangat. Disaring dan diambil filtrat kemudian diletakkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan FeCl_3 1% sebanyak 3 tetes . Jika sampel positif mengandung polifenol maka akan terjadi perubahan warna menjadi coklat kehitaman, biru kehitaman, hijau kehitaman. (Adhayanti *et al.*, 2018).

7.3 Tanin. Ditimbang 1 gram ekstrak lalu larutkan dengan 20 ml air panas lalu didinginkan dan disaring. Filtrat sebanyak 5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Pembentukan warna hijau kehitaman karena adanya reaksi dari FeCl_3 maka positif mengandung tanin (Depkes, 1995).

7.4 Saponin. Ditimbang 1 gram ekstrak, lalu masukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah dengan 10 ml air panas dan digojok selama 10 menit, sampai terbentuk busa lalu ditetesi dengan HCl 2N, bila buih tidak hilang maka ekstraksi tersebut positif mengandung saponin.

7.5 Alkaloid. Ditimbang 1 gram ekstrak lalu masukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan menggunakan 9 ml air dan 1 ml HCl 2N, kemudian dibagi menjadi 3 bagian. Hasil positif mengandung alkaloid menggunakan pereaksi Mayer akan terbentuk endapan putih kekuningan. Menggunakan pereaksi Wanger hasil positif ditandai terbentuknya endapan berwarna coklat. Pengujian menggunakan pereaksi Dragendrof membentuk endapan berwarna merah jingga menandakan hasil positif terdapatnya alkaloid (Lilyawati *et al.*, 2019).

8. Pengujian bakteri ekstrak buah apel manalagi

Pengujian antibakteri ekstrak buah apel manalagi dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Cawan porselin pertama diisi ekstrak buah apel manalagi konsentrasi 20%, cawan porselin kedua diisi ekstrak buah apel manalagi konsentrasi 15%, dan cawan porselin ketiga diisi ekstrak buah apel manalagi konsentrasi 10%. Siapkan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang sudah diinokulasikan bakteri *S. mutans* ATCC 25175. Kertas cakram dicelupkan pada ekstrak buah apel manalagi berbagai konsentrasi kemudian letakkan pada media MHA kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dilakukan pengamatan dengan mengukur zona hambat yang terbentuk menggunakan penggaris atau jangka sorong pada setiap kertas yang terdapat zona warna bening di sekitarnya (Putra *et al.*, 2017).

9. Pembuatan sediaan obat kumur

9.1 Formula obat kumur

Tabel 3. Formula obat kumur ekstrak buah apel manalagi.

Bahan	Formula			Kegunaan
	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	
Ekstrak buah apel manalagi	15	15	15	Zat aktif
Gliserin	15	20	25	Humektan
Natrium benzoate	0,1	0,1	0,1	Pengawet
Tween 80	1	1	1	Penstabil/emulgator
Sodium sakarin	0,1	0,1	0,1	Flavoring agent
Oleum menthae	0,3	0,3	0,3	Flavoring agent
Aqua destilata ad	100	100	100	Pelarut

Keterangan:

F1 : Formula 1 obat kumur ekstrak buah apel manalagi konsentrasi gliserin 15%

F2 : Formula 2 obat kumur ekstrak buah apel manalagi konsentrasi gliserin 20%

F3 : Formula 3 obat kumur ekstrak buah apel manalagi konsentrasi gliserin 25%

(Anastasya *et al.*, 2017)

9.2 Cara pembuatan. Pertama botol dikalibrasi, lalu seluruh bahan yang digunakan pada pembuatan sediaan obat kumur ditimbang. Natrium benzoate dan sodium sakarin dilarutkan pada 2 ml *aqua destilata* pengadukan dilakukan hingga bahan melarut (campuran 1). Ekstrak buah apel manalagi dan *oleum menthae* ditambah dengan tween 80 aduk hingga homogen, selanjutnya gliserin ditambahkan sedikit demi sedikit dan aduk sampai homogen (campuran 2). Campuran 1 tambahkan ke dalam campuran 2 sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga homogen, selanjutnya dimasukkan ke dalam botol. Tambahkan *aqua destilata* sampai tanda batas kalibrasi, kemudian kocok dan tutup botol dengan rapat. Dipindahkan ke dalam wadah untuk diamati. Lakukan untuk formula yang lainnya dengan

perlakuan yang sama dengan penambahan gliserin dengan variasi konsentrasi yang diuji.

10. Evaluasi mutu fisik obat kumur

Evaluasi stabilitas dan mutu fisik yang perlu dilakukan pada sediaan obat kumur:

10.1 Pemeriksaan organoleptik. Penilaian sediaan obat kumur dilakukan dengan mengamati bentuk, bau, warna, serta homogenitas. Pemeriksaan dilakukan pada suhu kamar (15-30°C). Dilakukan pengujian selama 4 minggu dengan waktu pengambilan data pengamatan pada minggu ke-1, minggu ke-2, minggu ke-3 dan minggu ke-4 (Depkes RI, 1995).

10.2 Pemeriksaan pH. Pemeriksaan menggunakan alat pH meter. Sebelumnya alat dikalibrasi dengan larutan dapar pH 4 dan pH 7. Elektroda dibilas dengan air suling dan keringkan kemudian elektroda dicelupkan dalam wadah obat kumur tersebut. Angka yang akan muncul pada alat pH meter adalah nilai pH sediaan tersebut. Sediaan obat kumur yang baik adalah mendekati pH mulut netral yaitu antara pH 6-7 (Hidayanto *et al*, 2017). Lakukan pengujian selama 4 minggu dengan waktu pengambilan data pengamatan pada minggu ke-1, minggu ke-2, minggu ke-3 dan minggu ke-4 (Depkes RI, 1995).

10.3 Pemeriksaan viskositas. Sediaan diukur viskositasnya menggunakan *viscometer oswald*. Pemeriksaan viskositas dilakukan dengan cara masukkan sampel dalam jumlah tertentu 5-10 ml ke dalam viskometer melalui bagian lubang pipa yang besar. Kosongkan udara pada *bulb filler*, pasang pipet kapiler viskometer berlubang kecil dengan bagian bawah *bulb filler*, kemudian sampel ditarik dengan bantuan pengisapan menggunakan *bulb filler* sampai miniskus bawah cairan tepat tanda batas viskometer. Siapakan *stopwatch* dan lepas *bulb filler* lalu hitung waktu cairan untuk mengalir dari batas atas hingga batas bawah dalam tabung dicatat sebagai waktu alir (Depkes RI, 1995).

$$\text{Rumus : } \frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{t_1 \cdot \rho_1}{t_2 \cdot \rho_2}$$

η_1 = Viskositas cairan sampel (sentipoise (cP))

η_2 = Viskositas cairan pembanding (sentipoise (cP))

ρ_1 = Massa Jenis dalam cairan sampel (gram/mL)

ρ_2 = Massa Jenis dalam cairan pembanding (gram/mL)

t_1 = Waktu aliran cairan sampel (detik)

t_2 = Waktu aliran cairan pembanding (detik).

Pengujian dilakukan selama 4 minggu dengan waktu pengambilan data pengamatan pada minggu ke-1, minggu ke-2, minggu ke-3 dan minggu ke-4.

10.4 Stabilitas. Pemeriksaan stabilitas dilakukan dengan melakukan pengamatan sediaan obat kumur pada suhu kamar dengan kurun waktu 0, 1, 2, 3 hingga minggu ke 4. Sediaan dinyatakan stabil apabila pH, viskometer, warna, bau, dan penampilan tidak berubah secara visual selama penyimpanan (Damanik, 2018).

11. Pengujian mikrobiologi

11.1 Sterilisasi alat dan bahan. Proses sterilisasi dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi mikroorganisme lain pada alat yang akan digunakan. Tahap pertama yang disterilisasi adalah semua alat berbahan silika dan alat-alat seperti labu ukur, gelas ukur, pinset dibungkus dengan kertas koran kemudian disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat lain seperti tabung reaksi dan cawan petri disterilkan menggunakan oven, dan alat-alat yang memiliki bahan dasar karet disterilkan dengan cara direndam dengan etanol 70% serta pensterilan jarum ose dilakukan dengan cara memanaskannya di atas lampu spiritus (Febryana *et al.*, 2018).

11.2 Peremajaan bakteri. Peremajaan bakteri memiliki tujuan agar bakteri memulai metabolisme kembali setelah penyiapan. Peremajaan bakteri diawali dengan bakteri murni yang di dapatkan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta diremajakan kembali dengan menginokulasikan bakteri *S. mutans* ATCC 25175 pada media NA dengan metode cawan gores yang dibagi menjadi 4 kuadran menggunakan jarum ose kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh secara tunggal diambil sebanyak 1 koloni. Bakteri diperbanyak dalam media NA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C. Kemudian pada hari selanjutnya didapatkan koloni kecil berwarna putih (Wijayati *et al.*, 2014).

11.3 Pembuatan suspensi *S. mutans* ATCC 25175.

Pembuatan suspensi bakteri dengan mengambil satu ose koloni biakan murni dan dimasukkan kedalam dengan menggunakan kawat ose steril dan disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 10 ml NaCl 0,9 % dan ditutup dengan kapas kemudian di vorteks. Dibuat sebanding dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml yang setara dengan 0,5 Mcfarland (Azzahra *et al*, 2019). Pembuatan suspensi bakteri ini bertujuan guna mengetahui jumlah koloni sesuai standar.

12. Identifikasi bakteri uji

12.1 Identifikasi bakteri berdasarkan morfologi koloni.

Bakteri diambil satu ose kemudian diinokulasikan dengan metode cawan gores yang dibagi sebanyak 4 kuadran. Biakan ditanam pada media selektif agar darah atau sering disebut dengan media BAP, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif pada bakteri *S. mutans* ATCC 25175 berwarna hijau. Selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi meliputi bentuk, tepi, elevasi, dan warna koloni.

12.2 Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram.

Identifikasi bakteri dengan pengecatan Gram dilakukan dengan cara menyiapkan media yang telah berisi sampel. Langkah-langkah pewarnaan Gram sebagai berikut yaitu bersihkan objek *glass* dengan alkohol hingga bebas lemak lalu buatlah olesan bakteri pada objek *glass* tersebut dan kering anginkan kemudian fiksasi dengan pemanasan, Bubuhi secara merata olesan tersebut dengan (kristal violet sebagai pewarna dasar) Gram A dan biarkan selama 30 detik, kemudian cuci sampai bersih dengan air mengalir kemudian bubuhi merata dengan larutan iodine (Gram B, larutan mordant), diamkan selama kurang lebih satu menit, kemudian cuci dengan air mengalir lalu tuangi dengan etil alkohol 93% Gram C (etanol:aseton=1:1, sebagai peluntur) selama 15 - 25 detik untuk dekolorisasi (penghilangan cat). Dekolorisasi telah terjadi dan berakhir ketika aliran solvent (etil alkohol) menjadi tidak berwarna lagi. Selanjutnya cuci bersih dengan air mengalir kemudian bubuhi dengan safranin sebagai pewarna penutup (Gram D) selama 45 detik lalu cuci dengan air mengalir dan kering anginkan atau keringkan dengan kertas penghisap kemudian dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x. Hasil pengamatan di foto lalu untuk bakteri yang tetap berwarna ungu adalah bakteri Gram positif. Sedangkan bakteri yang mengalami perubahan warna menjadi merah muda adalah bakteri Gram negatif.

Bakteri *S. mutans* ATCC 25175 adalah bakteri Gram positif (Inur *et al.*, 2020).

13. Identifikasi bakteri secara uji biokimia

14.1 Uji Katalase. Uji katalase dilakukan dengan meneteskan hidrogen peroksida (H_2O_2) 1-2 tetes pada objek glass yang bersih. Biakan bakteri diambil 1-2 ose kemudian ditetesi hidrogen peroksida. Hasil uji katalase untuk bakteri *S. mutans* ATCC 25175 adalah terbentuknya gelembung gas.

16.2 Uji koagulase. Uji koagulase dilakukan dengan memindahkan koloni yang diduga sebagai bakteri *S. mutans* ATCC 25175 dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi plasma kelinci 0,5 ml hingga rata, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji koagulase untuk bakteri *S. mutans* ATCC 25175 adalah negatif tidak terbentuk koagulan.

14. Pengujian antibakteri dengan metode cakram

Metode cakram diterapkan dalam menguji daya antibakteri. Ambil suspensi bakteri sebanyak 100 μ L, kemudian balurkan dengan merata pada medium *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan metode *spread plate*, selanjutnya diamkan hingga bakteri terdifusi ke media kurang lebih 10 menit. Berikutnya pada permukaan media MHA yang sudah dilakukan inokulasi bakteri, diberi cakram kertas yang telah di celupkan di dalam sediaan obat kumur formula I-IV, dan Kontrol positif. Hasil uji antibakteri didasarkan pada pengukuran zona diameter hambat, zona yang berwarna bening terbentuk disekitar cakram kertas diukur menggunakan penggaris.

Kontrol negatif yang digunakan adalah sediaan obat kumur yang tidak mengandung ekstrak buah apel manalagi. Kontrol positif digunakan sediaan obat kumur buah apel manalagi produk pasaran. Media yang sudah berisi bakteri uji yang telah dijenuhkan dengan larutan sediaan obat kumur formula I-III, kontrol positif dan kontrol negatif diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Uji dilakukan dengan tiga kali pengulangan.

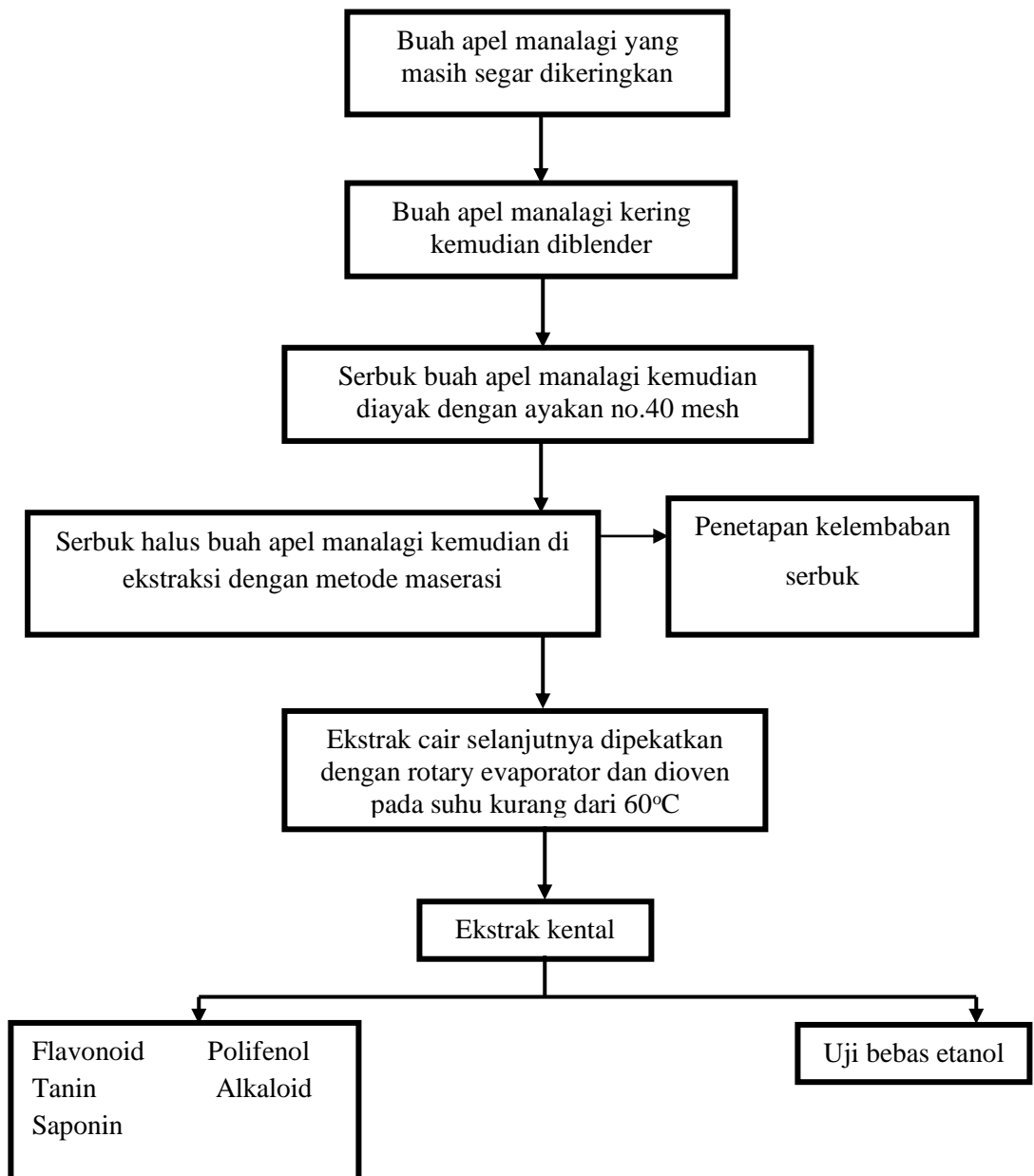
E. Analisis Hasil

Analisis data memiliki tujuan untuk mengetahui suatu data atas kesalahan saat penelitian dan kekeliruan dari aturan baku yang telah ditentukan. Analisis hasil dilakukan untuk melihat kesesuaian dengan aturan yang telah ditentukan untuk menghindari upaya kesalahan dalam

penelitian. Data yang didapat dalam bentuk tabel dan grafik dapat diolah dengan menggunakan SPSS menggunakan metode *Paired T-Test* dan ANOVA.

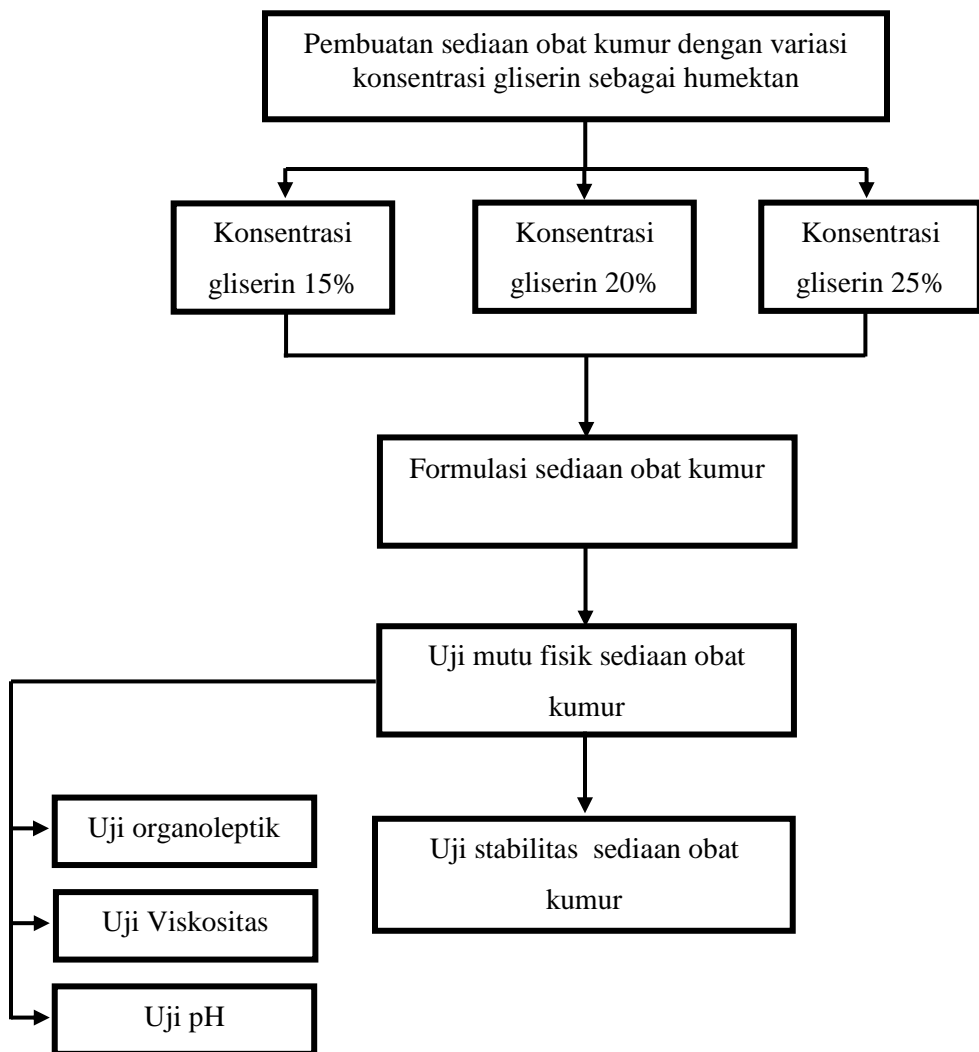
F. Alur Penelitian

1. Pembuatan simplisia hingga menjadi ekstrak kental



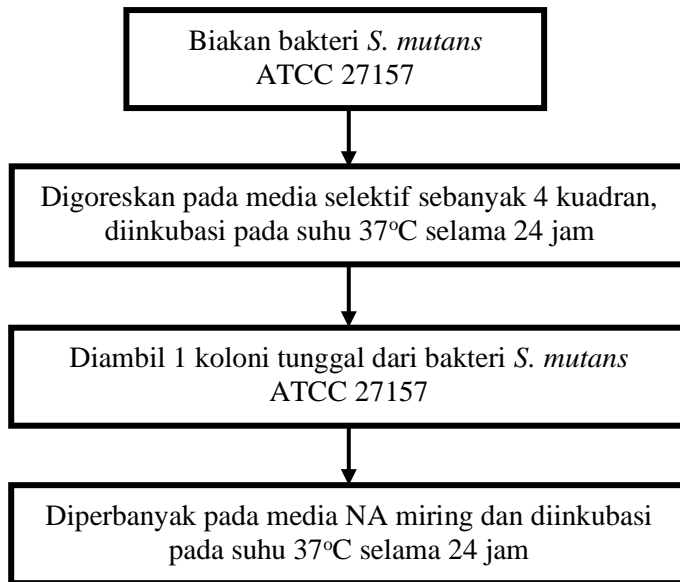
Gambar 7. Alur pembuatan simplisia hingga menjadi ekstrak kental.

2. Formulasi obat kumur



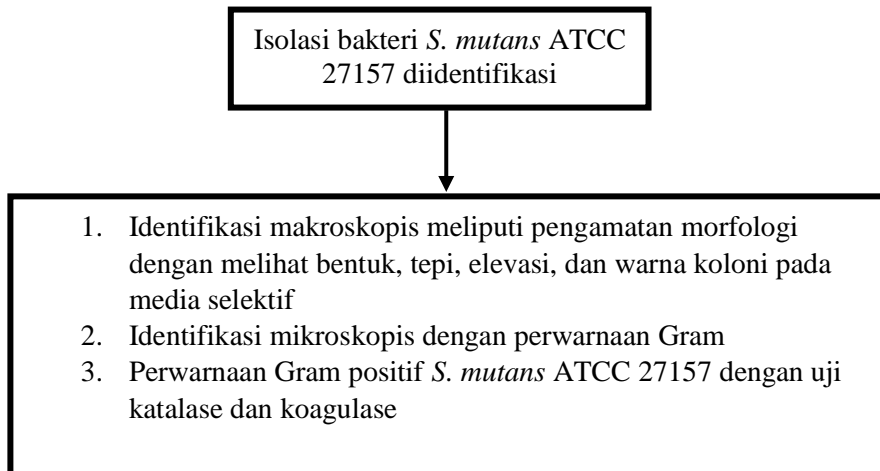
Gambar 8. Bagan alur formulasi sediaan obat kumur dan pengujian mutu fisik dan stabilitas.

3. Peremajaan bakteri



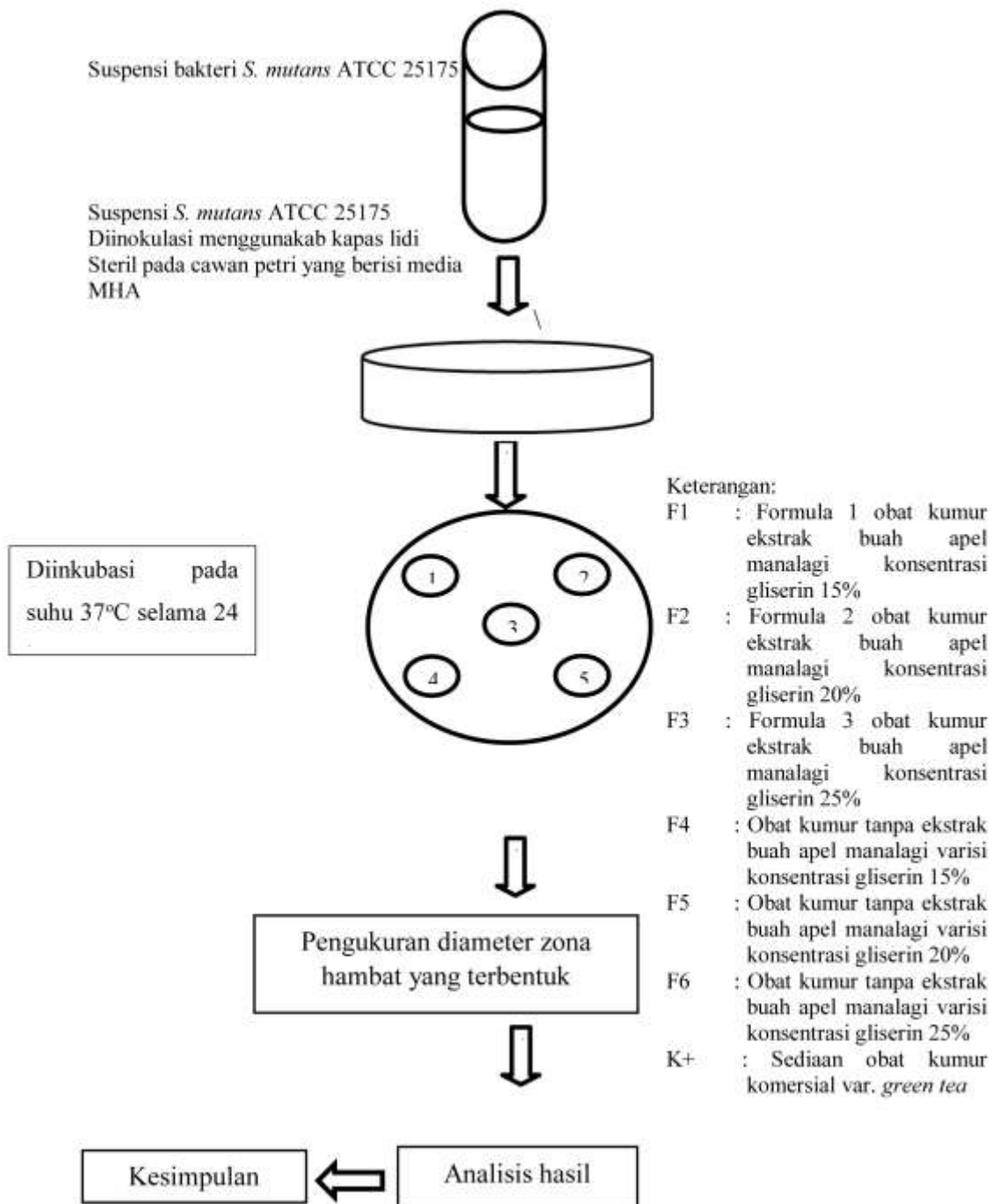
Gambar 9. Bagan alur peremajaan bakteri

4. Identifikasi bakteri



Gambar 10. Bagan alur Identifikasi bakteri

5. Pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram



Gambar 11. Skema pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram