

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah sediaan pasta gigi gel ekstrak buah apel manalagi dan CMC-Na sebagai bahan pengikat.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sediaan pasta gigi gel ekstrak buah apel manalagi dan CMC-Na sebagai bahan pengikat dengan variasi konsentrasi F1(1,5%), F2 (2%), F3 (2,5%).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini yaitu ekstrak buah apel manalagi (*Pyrus malus var. sylvestris* L) yang didapat dengan proses maserasi.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini yaitu sediaan pasta gigi gel antibakteri ekstrak buah apel manalagi dengan variasi konsentrasi CMC-Na 1,5 %, 2 %, dan 2,% sebagai pengikat serta dilakukan pengujian mutu fisik stabilitas pasta gigi gel dengan berbagai pengujian.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini yaitu aktivitas antibakteri pasta gigi gel atau *toothpaste* ekstrak buah apel manalagi (*Pyrus malus var. sylvestris* L) terhadap *S. mutans*.

2. Klasifikasi variabel utama

Klasifikasi variabel utama yaitu variabel bebas, variabel terkendali, serta variabel tergantung. Dalam penelitian ini variabel bebas yang dimaksud yaitu variasi konsentrasi CMC-Na sebagai bahan pengikat.

Variabel tergantung merupakan variabel yang menjadi kriteria konflik pada penelitian ini. Variabel yang dimaksudkan pada penelitian ini adalah mutu fisik meliputi organoleptik, pH, viskositas, stabilitas, dan aktivitas antibakteri dari sediaan pasta gigi gel ekstrak buah apel manalagi terhadap *S. mutans*

Variabel terkendali yaitu variabel yang berhubungan dengan variabel tergantung hingga dapat dilakukan penetapan kualifikasi agar hasil yang didapatkan tidak disebarluaskan sehingga dapat diulang

secara tepat oleh peneliti. Variabel terkendali yang dimaksudkan pada penelitian ini yaitu waktu inkubasi, suhu inkubasi, kondisi laboratrium, cara pembuatan, media yang digunakan, kondisi fisik peneliti, dan bakteri *S. mutans*.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, buah apel manalagi dilakukan determinasi tanaman yaitu buah dari tanaman apel berwarna hijau kekuningan, bersih, tidak busuk, dan terbebas dari hama penyakit yang diperoleh dari Kota Batu, Jawa Timur. Buah yang dipakai yaitu buah yang sudah tua memiliki warna hijau kekuningan dipilih apel tua karena pada buah yang sudah tua diketahui terdapat senyawa lain yang telah terkandung dan memiliki peran sebagai barrier utama untuk flavonoid dengan reaksi oksidasi.

Kedua, buah yang diperoleh dari tanaman apel varietas manalagi dilakukan sortasi dan dilakukan pencucian serta perajangan hingga bersih kemudian buah yang sudah bersih dipotong tipis lalu dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C, selanjutnya digunakan blender untuk menghaluskan serbuk kemudian dilakukan pengayakan dengan ayakan nomor 40 hingga didapatkan serbuk halus dari buah apel manalagi.

Ketiga, ekstrak buah apel manalagi merupakan hasil yang diperoleh dari ekstraksi pada serbuk buah apel manalagi menggunakan larutan penyari dengan etanol 70% dengan metode maserasi. Penggunaan etanol 70% dikarenakan merupakan pelarut polar yang mudah menguap sehingga baik digunakan sebagai pelarut ekstrak, selain itu lebih selektif, tidak beracun, tidak berbahaya, serta absorpsinya baik (Bruno, 2019).

Keempat, maserasi adalah metode ekstraksi dengan cara mengekstrak sediaan dengan cara merendam bahan nabati dengan pelarut etanol 70% menggunakan perbandingan 1:10 dan dilakukan penggojokan beberapa kali atau diaduk pada suhu ruang atau suhu kamar sesuai peraturan pada buku resmi kefarmasian.

Kelima, pasta gigi gel atau *toothpaste* merupakan sediaan pasta gigi yang dibuat dalam bentuk pasta dari ekstrak buah apel manalagi yang penggunaannya dengan cara menyikat atau menggosok.

Keenam Pasta gigi gel dibuat dengan menimbang semua bahan yang akan diformulasikan. CMC-Na dituang diatas air panas secara perlahan kemudian diaduk sampai homogen dan didiamkan selama 30 menit hingga mengembang sampai terbentuk campuran 1 (sebagai C1).

Dimortir yang berbeda CaCO_3 , gliserin, sorbitol, dan ekstrak buah apel manalagi digerus hingga membentuk massa campuran 2 (sebagai C2), kemudian C2 ditambahkan ke C1. Na sakarin, metil paraben, propil paraben, natrium lauril sulfat digerus di mortir yang berbeda ad halus, lalu ditambahkan C1 dan C2 digerus ad homogen. Selanjutnya digerus perlahan hingga membentuk pasta gel yang mengembang. Tahap terakhir formula dipisahkan dalam 3 wadah yaitu untuk uji mutu fisik, uji stabilitas, dan uji antibakteri (Marlina & Rosalini, 2017).

Ketujuh, evaluasi mutu fisik sediaan pasta gigi gel ekstrak buah apel manalagi adalah dengan pengujian sediaan pasta gigi gel terhadap pengujian uji organoleptik, uji pH, uji viskositas, uji stabilitas, uji daya sebar, dan uji pengukuran tinggi busa.

Kedelapan, bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *S. mutans* didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kesembilan, zona bening yang terbentuk pada kurang lebih lubang yang berisi sediaan pasta gigi gel yang diujikan merupakan diameter zona hambat.

Kesepuluh, metode yang dipergunakan untuk mengetahui aktivitas antibakteri pada penelitian ini dengan metode sumuran yang dilakukan dengan membuat satu lubang yang telah ditanamai mikroorganisme pada media dan pada lubang tersebut diberikan agen antibakteri yang akan diteliti dan diuji.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah timbangan, batang pengaduk, cawan porselin, gelas arloji, beaker glass, gelas kimia, tabung reaksi, corong, botol, botol mulut lebar, botol coklat maserasi, ayakan, kertas saring, kain flannel, bunsen, waterbath, kurs porselen, *moisture balance*, *rotary evaporator*, autoclave, incubator, oven, penggiling (blender), *viscometer brookfield*, perfolator, jangka, jarum ose, LAF atau laminar airflow, mikroskop, mikropipet, *object glass*, deck glass, cawan petri kertas perkamen, mortir dan stemper, pH meter, pipet tetes, sendok tanduk, seperangkat alat maserasi, dan neraca analitik.

2. Bahan

2.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang dipakai adalah buah apel manalagi yang diperoleh dari daerah Poncokusuma, Jawa timur.

Buah yang dipilih berwarna hijau kekuningan, bersih, tidak busuk, serta bebas hama dan bebas penyakit, dilakukan pengambilan buah apel manalagi pada bulan Januari-februari karena masa panen dari bulan Januari sampai maret.

2.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang dipakai adalah etanol 70%, gliserin, metil paraben, propil paraben, natrium sakain, sorbitol, kalsium karbonat, CMC-Na, dan sodium lauryl sulfat, aquadest, spiritus, NaCl, reagen mayer, reagen Bouchardat, reagen Dragendrof, asam klorida, H₂SO₄ pekat, H₂O₂ 3%, FeCl₃, MHA, crystal violet, lugol, aseton, safranin.

2.3. Bakteri yang digunakan. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman apel manalagi

Determinasi tanaman apel manalagi untuk menetapkan kebenaran sampel buah apel manalagi berdasarkan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis, ditujukan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan, menghindari kemungkinan tercampurnya bahan dengan tanaman lain serta mencocokkan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman apel manalagi, determinasi dilakukan di Universitas Setia Budi.

2. Pengambilan sampel

Sampel buah apel manalagi yaitu buah dari tanaman apel yang memiliki warna hijau kekuningan, bersih, tidak busuk, serta bebas dari hama penyakit yang didapatkan dari Kota Batu, Jawa Timur. Cara panen buah apel manalagi yaitu dengan ciri-ciri ukuran buah maksimal, aroma mulai terasa, dan warna buah segar kuning kehijauan pada umur kisaran 5 bulan.

3. Preparasi sampel

Sampel buah apel manalagi dipilih yang segar, tidak busuk, dan tebebas dari hama penyakit kemudian buah apel dilakukan sortasi basah, dibersihkan, dirajang, lalu keringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C kemudian setelah kering, lalu dilakukan sortasi kering.

4. Pembuatan serbuk buah apel manalagi

Sampel yang sudah dikeringkan dan sudah dilakukan sortasi kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender atau

digiling, lalu dilakukan pengayakan dengan ayakan nomor 40 sampai didapatkan serbuk halus dan homogen.

5. Penetapan kadar susut pengeringan serbuk

Pada Penetapan kelembaban serbuk simplisia buah apel manalagi digunakan alat *moisture balance* dengan cara menyalakan alat dan mengatur suhu dan waktu menjadi 105°C selama 15 menit kemudian serbuk buah apel manalagi ditimbang 2 gram langsung pada alat *moisture balance* lalu tutup rapat alat dan tunggu hingga diperoleh kadar kelembaban serbuk buah apel manalagi yang konstan dan melakukan replikasi sebanyak 3 kali (Kemenkes RI, 2017).

6. Penetapan kadar air serbuk

Pada penetapan kadar air serbuk dilakukan dengan menggunakan destilasi *sterling bidwell* dan pelarut toluene. Tahap pertama yaitu melakukan penjuhan toluena dan air dengan menggunakan corong pisah kemudian ditimbang serbuk simplisia 20 gram lalu dimasukkan kedalam labu alas bulat dan direndam dengan toluena yang telah dijenuhkan. Proses destilasi dilakukan selama 15 menit setelah semua air tersuling dilanjutkan dengan pemanasan selama 5 menit. Kadar air dibaca ketika terjadi pemisahan sempurna (Kemenkes RI, 2017).

7. Pembuatan ekstrak buah apel manalagi

Tahap ekstraksi dilakukan dengan teknik maserasi yaitu 1 bagian serbuk tanaman apel ditimbang kemudian direndam dalam 10 bagian etanol 70% pada botol maserasi. Perendaman pertama dilakukan 6 jam sambil diaduk lalu dibiarkan selama 18 jam pada suhu kamar. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan penyaringan menggunakan kain flannel dan kertas sarin kemudian ampas yang didapat ditampung kembali dan dilakukan proses remaserasi selama 24 jam. Kemudian seluruh maserat diuapkan pada *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C sampai didapatkan ekstrak pekat. Lalu dihitung rendemen yaitu persen berat (b/b) serta rendemen dan berat serbuk simplisia yang digunakan untuk penimbangan. Harus didapatkan hasil yang sesuai dengan jumlah minimum yang tercantum pada masing-masing monografi (Kemenkes RI, 2017).

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

8. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak

Identifikasi kandungan suatu senyawa pada suatu ekstrak dimaksudkan untuk mengetahui dan menjamin keakuratan dari bahan kimia yang terkandung didalam ekstrak buah apel manalagi dengan

menggunakan metode uji tabung. Dilakukan identifikasi pada senyawa golongan flavonoid, tanin, saponin, alkaloid dan polifenol.

8.1 Flavonoid. Sebanyak satu gram ekstrak buah apel manalagi dilarutkan dalam 20 ml air mendidih, selanjutnya 5 menit dilakukan pemanasan kemudian dilakukan pendinginan setelah dingin dilakukan penyaringan selanjutnya sebanyak 5 ml pada filtrat dilakukan pengambilan dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. 5 tetes H_2SO_4 pekat dimasukkan kedalam masing-masing tabung reaksi. Jika warna setiap larutan berubah menjadi kuning jingga, maka larutan tersebut positif mengandung flavonoid (Ergina *et al.*, 2014).

8.2 Tanin. Sebanyak satu gram ekstrak buah apel manalagi dilarutkan dalam 20 ml air mendidih, dinginkan dan saring. Pada tabung reaksi ditambahkan filtrat sebanyak 5 ml dan ditambahkan 3 tetes reagen FeCl_3 1%. Jika membentuk warna hijau kehitaman pada reaksi FeCl_3 maka positif mengandung tannin (Ergina *et al.*, 2014).

8.3 Saponin. Sebanyak satu gram ekstrak buah apel manalagi ditambahkan 10 mL air mendidih, kemudian dilakukan pendinginan dan pengocokan secara kuat selama 10 detik hingga membentuk busa dengan tinggi 1-2 cm. Selanjutnya dilakukan penambahan 1 tetes HCl 2 N melalui dinding tabung reaksi. Pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, jika busa tidak hilang maka sampel mengandung saponin (Marpaung & Romelan, 2019).

8.4 Alkaloid. Sebanyak satu gram ekstrak buah apel manalagi dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi yang berbeda masing-masing sebanyak 2 ml, lalu ditambahkan 1 ml HCl 2N. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen mayer. Hasil positif apabila larutan membentuk endapan jingga. Tabung II ditambahkan 2-3 tetes reagen wagner. Hasil positif apabila larutan membentuk warna hijau kehitaman. Tabung III ditambahkan 2-3 tetes reagen dragendroff. Hasil positif pada alkaloid ditandai dengan terbentuknya larutan endapan jingga (Lilyawati *et al.*, 2019).

8.5 Polifenol. Sebanyak satu gram ekstrak kemudian direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%. Hasil positif polifenol berwarna hijau, merah ungu, biru, atau hitam yang kuat menunjukkan bahwa adanya polifenolat (Wardhani & Sulistyani, 2012).

9. Penetapan kadar air ekstrak buah apel manalagi

Dilakukan pengujian kadar lembab ekstrak buah apel manalagi dengan metode gravimetri menggunakan oven. Pertama dengan

memasukkan 10 gram ekstrak pada krus kemudian dipanaskan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Panaskan kembali di oven selama 1 jam hingga terdapat perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

10. Pengujian bebas etanol

Dilakukan pengujian bebas etanol yaitu agar etanol dari ekstrak dibebaskan hingga diperoleh ekstrak murni tanpa kontaminasi dan ekstrak yang didapatkan bebas dari cairan penyari. Etanol memiliki sifat sebagai antibakteri dan antjamur dan tidak akan mengakibatkan hasil positif palsu pada perlakuan sampel (Kurniawati, 2015). Uji bebas etanol dengan menambahkan asam asetat dan asam sulfat kedalam ekstrak dan panaskan. Jika tidak ada bau ester yang khas pada etanol maka ekstrak dikatakan bebas etanol (Yulia Agtalis, 2018).

11. Sterilisasi

Proses sterilisasi agar tidak terjadi kontaminasi mikroorganisme pada alat yang akan digunakan. Tahap pertama alat disterilisasi yaitu seluruh alat yang mempunyai bahan silika dan alat-alat seperti labu ukur, gelas ukur, pinset dibungkus dengan kertas koran dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C. Alat lain seperti tabung reaksi dan cawan petri di sterilkan menggunakan oven, dan alat-alat yang memiliki bahan dasar karet disterilkan dengan cara perendaman menggunakan etanol 70% serta penyeterilan jarum ose yaitu dengan dipanaskan di atas lampu spiritus (Febryana *et al.*, 2018)..

12. Pembuatan media uji

12.1 Pembuatan media Mueller Hinton Agar. Pembuatan Muller Hinton Agar (MHA) yaitu ditimbang sebanyak 38 g MHA kemudian melarutkan aquades sebanyak 1000 ml, lalu panaskan hingga mendidih. Sterilkan larutan dalam autoklaf pada selama 25 menit pada suhu 121°, jika sudah steril maka tunggu hingga suhu pada MHA menurun menjadi 40°C, kemudian tuangkan MHA ke dalam cawan petri yang sudah disterilkan (Nofita, 2021).

12.2 Pembuatan media blood agar plate (BAP). Pembuatan media BAP yaitu dengan menimbang serbuk BAP sebanyak 20 gram lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan aquadest sampai tanda 500 ml, aduk sampai merata dan panaskan hingga homogen kemudian larutan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit kemudian larutan ditambahkan darah sebanyak 35 ml

dan dihomogenkan dengan cara digoyang perlahan lalu dipindahkan sebanyak 1 ml larutan kedalam cawan petri (Nurhidayanti, 2019).

12.3 Pembuatan media nutrient agar (NA). Pembuatan media NA yaitu dengan menimbang sebanyak 2,8 g kemudian dilarutkan kedalam 100 ml aquadest didalam erlenmeyer 100 ml lalu media dihomogenkan dengan stirrer sekaligus dipanaskan dengan menggunakan hot plate. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit kemudian media cair dituangkan kedalam cawan petri sebanyak 10 ml dan didinginkan hingga memadat (Diasita, 2017).

13 Peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri memiliki tujuan agar bakteri memulai metabolisme kembali setelah penyiapan, isolat murni bakteri *S. mutans* didapatkan dari stok bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Peremajaan bakteri yaitu diambil satu jarum ose biakan murni lalu dilakukan penggoresan secara zig-zag dari pangkal hingga ujung media miring Nutrient Agar (NA), selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam suhu 37°C (Wijayati *et al.*, 2014).

14 Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus mutans*

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan biakan murni *S. mutans* kemudian biakan tersebut dilakukan peremajaan bakteri dengan cara mengambil sebanyak 1 ose lalu dimasukkan kedalam tabung sudah berisi NaCl selanjutnya di vortex. Hasil yang diperoleh dibandingkan kekeruhannya dengan Mac Farland 0,5. Menurut Whitman dan Nair (2010) menyatakan bahwa kekeruhan suspensi bakteri disesuaikan dengan standar Mac Farland 0,5 yang memiliki jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ sel /mL.

15 Identifikasi bakteri uji

15.1 Identifikasi bakteri pada media agar darah. Pada media agar darah dilakukan dengan cara biakan ditanam pada media selektif agar darah atau sering disebut dengan media BAP, lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil ditunjukkan dengan koloni berwarna hijau karena terjadi perubahan media yaitu adanya *hemolysis alfa* pada sel darah merah dengan adanya koloni berwarna putih dengan tepian koloni berwarna hijau membuktikan karakteristik sifat *alpha hemolysis* yaitu reduksi hemoglobin pada sel darah merah menjadi methemoglobin.

15.2 Identifikasi bakteri dengan pengecatan Gram. Tujuan untuk mengetahui sifat dan morofologi pada gram bakteri. Langkah-langkah pewarnaan gram dilakukan dengan cara mengoleskan bakteri pada object glass lalu ditetesi dengan Gram A (kristal violet) kemudian didiamkan selama 1 menit selanjutnya dibasuh menggunakan air mengalir. Object glass ditetesi kembali dengan Gram B (larutan I₂ atau KI) lalu didiamkan selama 1 menit kemudian dibasuh dengan cara meneteskan Gram C (etanol) agar zat warna memudar dan dibasuh kembali menggunakan air mengalir lalu object glass ditetesi dengan safranin lalu didiamkan selama 30 detik, kemudian dicuci dengan aquadest lalu preparat ditetesi dengan larutan Gram D (safranin) kemudian didiamkan selama 1 menit dan dikering anginkan. Setelah kering diamati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 100x dengan bantuan larutan emersi. Selanjutnya pada hasil yang telah diamati di foto, selanjutnya bakteri yang tidak berubah dan tetap berwarna ungu adalah bakteri gram positif, Sedangkan bakteri yang mengalami perubahan warna menjadi merah muda adalah bakteri Gram negatif. Jika diperoleh sel dengan morfologi coccus serta membentuk koloni seperti rantai dan berwarna violet maka hasil pewarnaan adalah Gram positif (Inur *et al.*, 2020).

15.3 Uji katalase. Dilakukan dengan H₂O₂ diletakkan diatas object glass kemudian ditambahkan dengan bakteri *S. mutans*. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung udara dan demikian sebaliknya. Hasil uji katalase negatif mencirikan sel-sel bakteri uji (Inur *et al.*, 2020).

15.4 Uji koagulase. Dilakukan dengan mengambil 200 µl plasma kelinci kemudian dimasukkan kedalam tabung lalu secara aseptis dimasukkan bakteri *S. mutans* sebanyak 1-2 koloni, selanjutnya dicampur dengan hati-hati dan diinkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan pertama dilakukan pada 24 jam pertama hasil positif ditandai dengan adanya gumpalan pada tabung (Jiwintarum *et al.*, 2015).

16 Pengujian antibakteri ekstrak buah apel manalagi

Pengujian antibakteri dalam penelitian ini yaitu dengan metode difusi cakram. Disiapkan botol vial sebanyak 3 buah kemudian masing-masing diisi dengan ekstrak buah apel manalagi dengan berbagai konsentrasi menggunakan pelarut DMSO 2%. Botol vial pertama diisi ekstrak buah apel manalagi konsentrasi 10%. Botol vial kedua diisi

ekstrak buah apel manalagi konsentrasi 15%, dan botol vial ketiga diisi dengan ekstrak buah apel manalagi konsentrasi 20%. Kemudian disiapkan media *Muceller Hinton Agar* (MHA) yang telah diinokulasikan bakteri *S. mutans*. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dilakukan dengan mencelupkan kertas cakram kedalam ekstrak dan diletakkan diatas media secara aseptis selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Lalu dilakukan pengamatan dengan mengukur zona bening yang terbentuk setelah diinkubasi menggunakan penggaris ataupun jangka sorong pada masing-masing lubang yang terdapat zona bening (Putra *et al.*,2018).

17 Pembuatan sediaan pasta gigi gel atau toothpaste

17.1 Formula sediaan pasta gigi gel

Tabel 3. Rancangan Formula Pasta Gigi Gel yang telah dimodifikasi

Bahan	Formula			Kegunaan
	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	
Ekstrak buah apel manalagi	15	15	15	Zat aktif
CMC-Na	1,5	2	2,5	Pengikat
Gliserin	5	5	5	Pelembab
Kalsium karbonat	0,5	0,5	0,5	Penggosok
Sorbitol (70%)	20	20	20	Pelembab
Natrium sakarin	0,25	0,25	0,25	Pemanis
Metil paraben	0,5	0,5	0,5	Pengawet
Propil paraben	0,25	0,25	0,25	Pengawet
Natrium lauril sulfat	0,5	0,5	0,5	Bahan pembentuk busa
Aquadest ad	100	100	100	Pelarut

Keterangan :

Formula 1 : sebagai Formula 1 (CMC-Na 1,5% dan ekstrak apel manalagi 15%)

Formula 2 : sebagai Formula 2 (CMC-Na 2% dan ekstrak apel manalagi 15%)

Formula 3 : sebagai Formula 3 (CMC-Na 2,5% dan ekstrak apel manalagi 15%)

Kontrol positif : sebagai kontrol positif (Pepsodent komersial)

17.2 Cara pembuatan sediaan pasta gigi. Pasta gigi gel dibuat dengan menimbang semua bahan yang akan diformulasikan. CMC-Na dituang diatas air panas secara perlahan kemudian diaduk ad homogen dan didiamkan selama 30 menit hingga mengembang sampai terbentuk campuran 1 (sebagai C1). Mortir kedua digerus CaCO_3 , gliserin, sorbitol, dan ekstrak buah apel manalagi hingga membentuk massa gel campuran 2 (sebagai C2), kemudian C2 ditambahkan ke C1. Na sakarin, metil paraben, propil paraben, natrium lauril sulfat digerus di mortir yang berbeda ad halus, lalu ditambahkan C1 dan C2 digerus ad homogen. selanjutnya digerus perlahan hingga membentuk pasta gel

yang mengembangkan. Tahap terakhir formula dipisahkan dalam 3 wadah yaitu untuk uji mutu fisik, uji stabilitas, dan uji antibakteri (Marlina & Rosalini, 2017).

18 Pembuatan kontrol uji aktivitas

18.1 Kontrol negatif. Digunakan sediaan pasta gigi gel tanpa ekstrak

18.2 Kontrol positif. Digunakan sediaan pasta gigi pepsodent action 123 untuk gigi berlubang.

19 Evaluasi mutu fisik sediaan pasta gigi

Evaluasi mutu fisik dan stabilitas yang perlu dilakukan pada sediaan pasta gigi atau toothpaste.

19.1 Pemeriksaan organoleptik. Pemeriksaan organoleptik dilakukan dengan cara diamati secara langsung seperti bau, warna, dan bentuknya (Y. P. Utami *et al.*, 2017).

19.2 Pemeriksaan homogenitas. Pemeriksaan homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan pasta gigi gel ketas *object glass* kemudian dilihat homogenitasnya dengan menunjukkan adanya susunan homogen pada sediaan serta tidak terdapat butiran kasar (Ningsi *et al.*, 2016).

19.3 Pemeriksaan pH. Pemeriksaan pH dengan pH meter (6+ *Eutech Instruments*) yang kemudian alat dilakukan kalibrasi dengan dapar pH 7,00 dan pH basa 10,00. Elektroda dibilas dengan aquadest dan dikeringkan, lalu sampel disiapkan 1% (0,5 g pasta dilarutkan dengan aquadest ad 50 ml). Elektroda dicelupkan pada sampel hingga menunjukkan hasil yang konstan, pH sediaan pasta gigi yang bagus yaitu berkisar 4,5-10,5. Pengujian dilakukan dengan mengambil data pada hari ke-1 sampai hari ke-21 (Rasyadi, 2018).

19.4 Pemeriksaan viskositas. Pengukuran viskositas sediaan menggunakan *viskometer VT-04 ERION Ltd* kemudian spindle dimasukkan hingga kedalaman tertentu. Hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan *Decipascal second* berupa angka yang ditampilkan pada monitor. Syarat mutu viskositas sediaan pasta gel yaitu 50-500 dPas (Badan Standar Nasional, 1995).

19.5 Pemeriksaan stabilitas. Pemeriksaan stabilitas dilakukan dengan menggunakan Metode *Cycling test*. Sediaan pasta gigi selama 24 jam disimpan pada suhu (40°C) dalam oven kemudian dilanjutkan dengan meletakkan sediaan pasta gigi gel pada suhu ruang selama 24 jam terhitung 1 siklus. Pengujian stabilitas dilakukan sebanyak 3 siklus

dan diamati terjadinya perubahan fisik dari awal hingga akhir siklus lalu diamati terjadinya perubahan fisik seperti organoleptis, pH, dan viskositas dari sediaan pasta gigi gel (Wardani H, Oktaviani R, 2016).

19.6 Uji daya sebar. Dilakukan dengan menggunakan alat *extensometer*, pengujian dengan cara meletakkan 0,5 pasta gigi gel pada kaca tengah berskala kemudian permukaan massa pasta gigi gel diberi kaca penutup dan dibiarkan selama 1 menit lalu diameter gel yang menyebar akibat tekanan yang diletakkan diukur dengan menghitung rata-rata diameter dari tiap sisi. Pengujian dilakukan terhadap anak timbang 50, 100, 150, dan 200 g sebagai bahan tambahan, tiap penambahan beban dibiarkan selama 1 menit lalu diameter yang tersebar dicatat. Syarat mutu daya sebar yaitu 5-7 cm.

19.7 Uji pengukuran tinggi busa. Ditimbang 1% sediaan pasta gigi kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur dan ditambah 10 ml aquadest lalu campuran dikocok selama 20 detik dengan membalikkan gelas ukur secara beraturan kemudian didiamkan selama 5 menit lalu tinggi buih yang telah terbentuk diukur dengan mistar.

20 Pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram

Pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram yaitu pasta gigi gel ekstrak apel manalagi disiapkan sesuai formulasi dengan variasi konsentrasi CMC-Na. Larutan uji disiapkan dengan melarutkan 2 gram pasta gigi gel dalam 2 ml aquadest steril. Suspensi bakteri uji diinokulasikan pada media MHA kemudian diratakan menggunakan kapas steril dan didiamkan hingga kering, kertas cakram yang telah direndam ke dalam masing-masing variasi konsentrasi CMC-Na selama 15 menit kemudian diletakkan di atas permukaan media agar secara aseptik selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C lalu diamati zona bening yang terbentuk disekeliling kertas cakram diketahui dapat mengukur sensitivitas bakteri lebih besar. Dari konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi pada metode difusi cakram dapat terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat sehingga konsentrasi pada ekstrak lebih besar dalam mengganggu pertumbuhan bakteri. Diameter zona bening sebanding dengan jumlah mikroba uji yang ditambahkan pada kertas cakram (Nurhayati *et al.*, 2020).

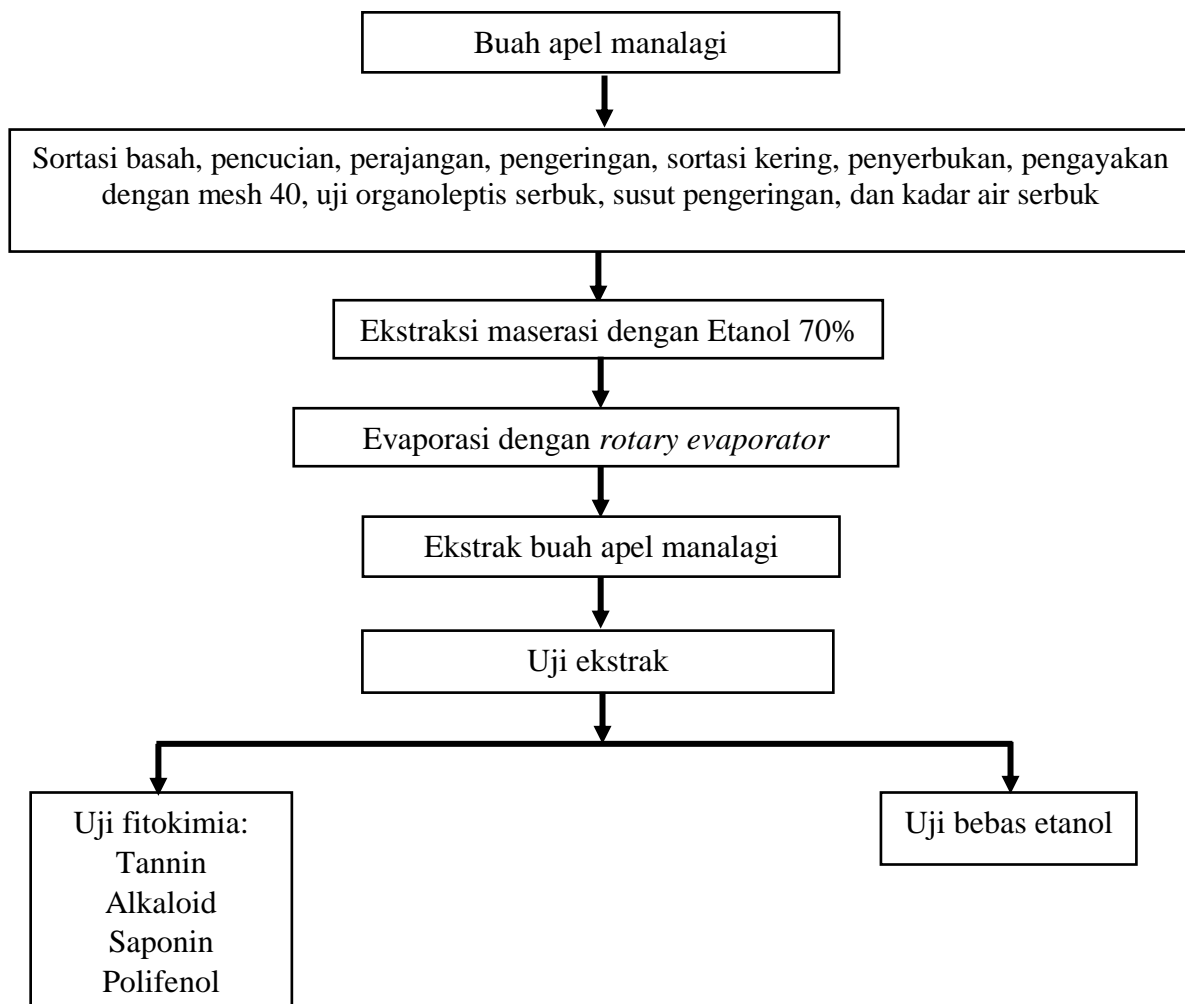
Kertas cakram yang digunakan adalah 5 karena terdapat 3 formula pada sediaan pasta gigi gel atau toothpaste yang akan diuji, satu cakram sebagai kontrol negatif, dan satu cakram untuk kontrol positif. Kemudian dilakukan pengukuran zona hambat dengan cara

menggunakan penggaris ukuran millimeter (mm) ataupun menggunakan jangka sorong sehingga zona bening dapat diukur diameternya.

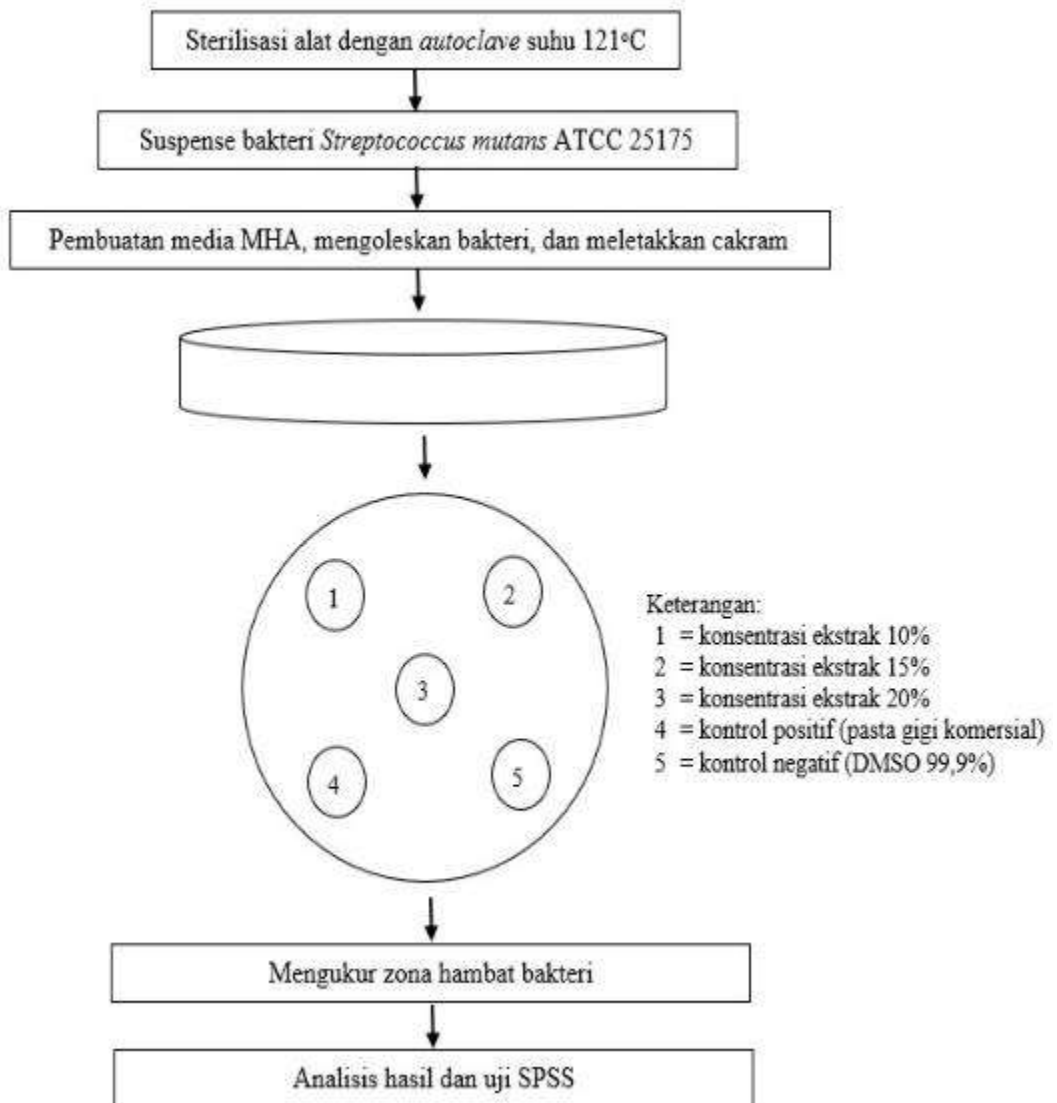
E. Analisis Hasil

Data yang diperoleh dari pengujian mutu fisik dan aktivitas antibakteri kemudian dianalisis menggunakan pendekatan statistic dengan program SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Dilakukan analisis *Shapiro -Wilk* untuk mengetahui normalitas data yang dianalisis. Jika data terdistribusi normal ($p > 0.05$) maka selanjutnya dilakukan analisis dengan *one way anova*, dan dilanjutkan dengan uji *post hoc Turkey*, sedangkan untuk data yang tidak terdistribusi normal ($p < 0.05$) dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis* dilanjut Wilcoxon, sedangkan untuk mengetahui perbedaan antara dua variable yang saling berikatan digunakan uji *Paired T-test*.

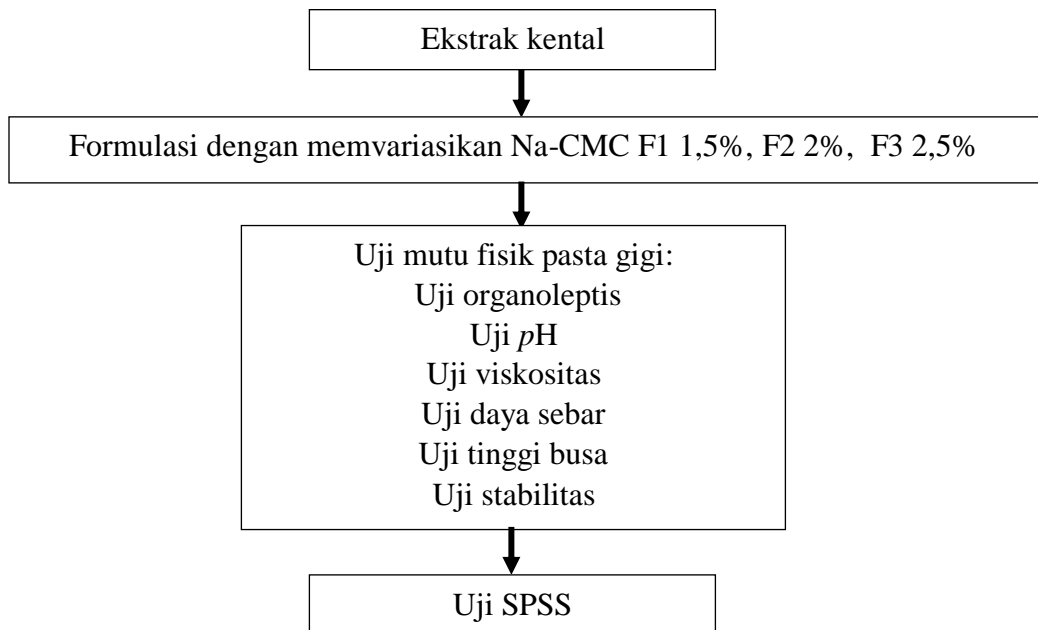
F. Skema Penelitian



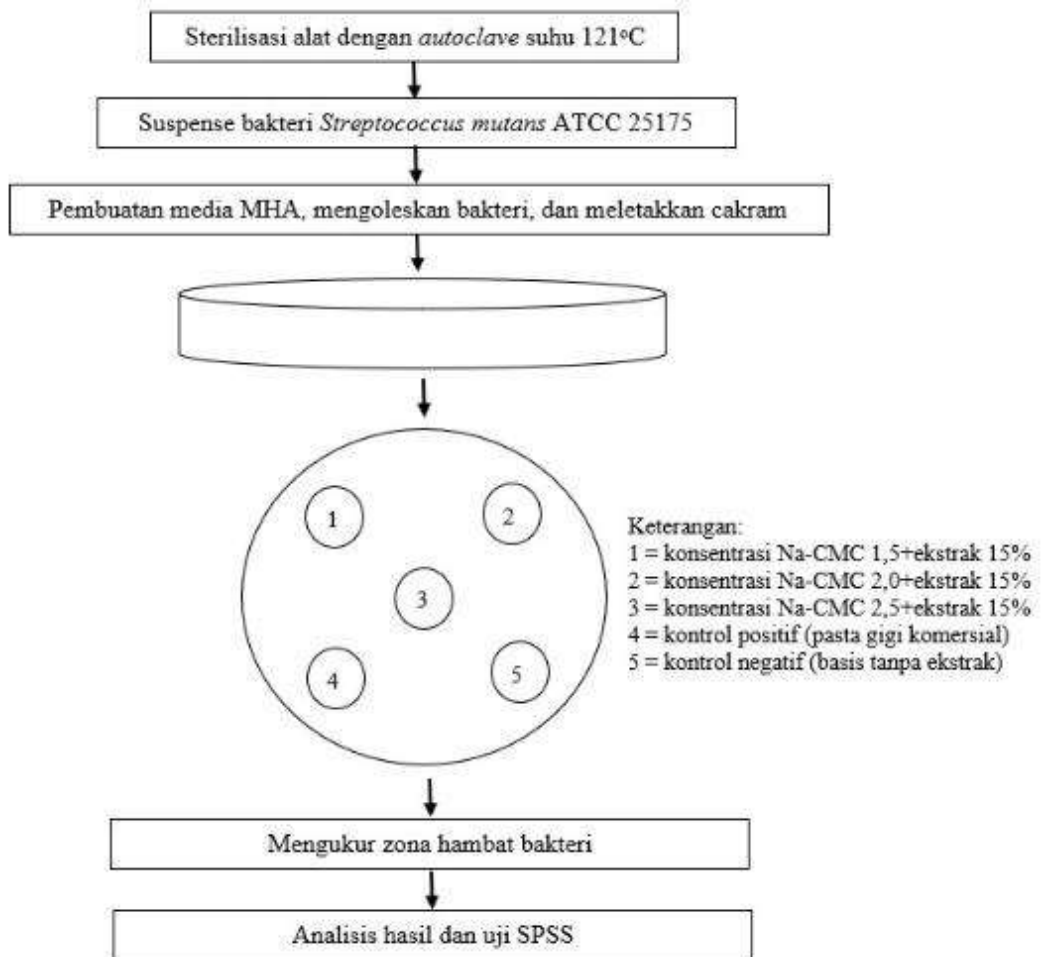
Gambar 13. Alur proses pembuatan ekstrak buah apel manalagi.



Gambar 14. Alur proses orientasi ekstrak buah apel manalagi.



Gambar 15. Alur proses pembuatan sediaan pasta gigi gel ekstrak buah apel manalagi.



Gambar 16. Alur proses pengujian antibakteri sediaan pasta gigi gel ekstrak apel manalagi