

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Pada penelitian ini digunakan alat-alat yang terdiri dari aluminium foil, autoklaf, batang pengaduk, cawan porselin, inkubator, *laminar Air Flow (LAF)*, mikser, neraca analitik pH meter D-71 (LAQUA act), pengayak, muller machine, oven, viscometer *brookfield*, cawan petri, batang pengaduk, ose, *microwave*, oce, cawan petri, spider dan peralatan gelas lainnya (pyrex).

3.1.2 Bahan

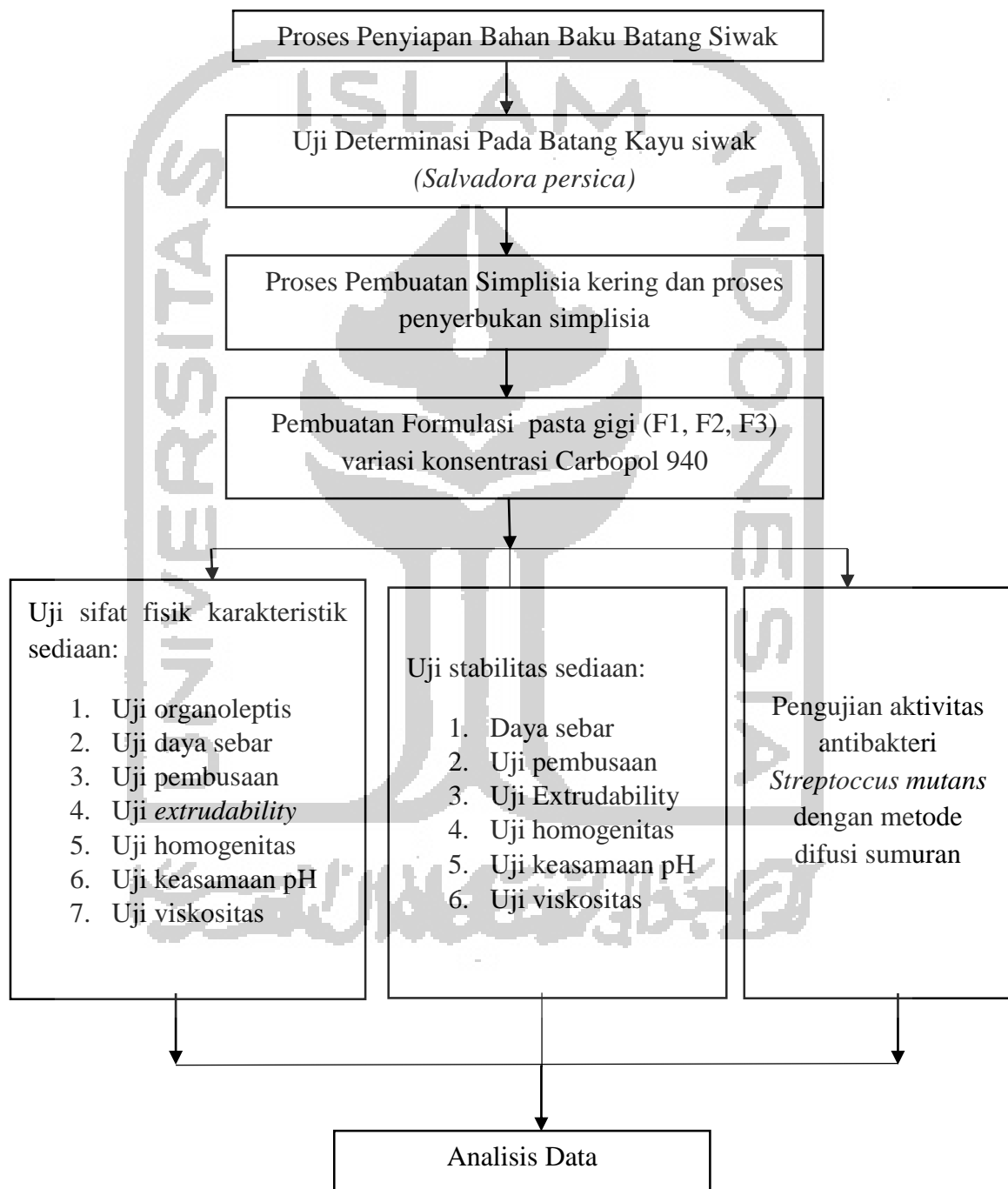
Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini ialah kayu siwak (diperoleh dari Argo bibit tanaman), carbopol 940, (CaCO₃) kalsium karbonat (kualitas farmasetis), Na.Lauril Sulfat (kualitas farmasetis), propil paraben (UENO), gom arab (kualitas farmasetis), aquadest, darah manusia golongan O, gliserin (kualitas farmasetis), sakarin (*food grade*) dan minyak peppermint. NaCl 0,9% Nutrient Agar (NA), Mauller Hinton Agar (MHA), Mauller Hinton Broth (MHB), dan bakteri *Streptococcus mutans* yang didapat dari laboratorium mikrobiologi USU.

3.2 Cara Penelitian

3.2.1 Skema Penelitian

Pada penelitian ini pertama kali yaitu pembelian bahan baku pohon siwak yang digunakan, kemudian dilakukan uji identifikasi atau uji determinasi pada pohon siwak agar tidak terjadi kesalahan pada bahan baku yang akan digunakan dalam penelitian ini, setelah menggunakan identifikasi ambil batang siwak dan dibersihkan setelah bersih kemudian dimasukkan kedalam oven pada suhu 60⁰C selama 24 jam kemudian dilakukan proses penyerbukan dengan menggunakan alat *muller machine* proses selanjutnya pembuatan sediaan pasta gigi bubuk siwak sebanyak tiga formulasi dengan variasi konsentrasi *gelling agent* Carbopol 940, dilakukan pengujian formulasi pada formulasi yang telah dibuat dimana ada uji sifat

fisik yang meliputi yaitu uji organoleptis, uji tinggi busa, uji daya sebar dan uji *extrudability*, sedangkan uji stabilitas meliputi uji homogenitas, uji pH dan uji viskositas, selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran, setelah semua data didapatkan kemudian dilakukan analisis data.



Gambar 3.1. Skema penelitian

3.2.2 Formulasi Sediaan Pasta Gigi

Dibuat tiga formula pasta gigi yang mengandung bahan zat aktif bubuk siwak sebagai antibakteri masing-masing dengan konsentrasi 3g, bahan pengikat carbopol 940 ditimbang dengan variasi formula 1 sebanyak 1g, formula 2 1,5g dan formula 3 2g, dikembangkan dengan aquadest didalam cawan lalu dimasukan dalam mortir, kalsium karbonat ditimbang 30g ditambahkan sedikit demi sedikit kedalam pengikat sambil diaduk hingga homogen, ditambahkan gliserin 10 gram diaduk hingga homogen, sakarin dilarutkan dalam aquadest aduk sampai homogen. Na.Lauril sulfat ditimbang 2gram dilarutkan dalam aquadest dan dicampur, diaduk hingga homogen. propil paraben ditimbang 0,02gram dilarutkan dengan aquadest, gom arab berfungsi sebagai stabilizer ditimbang 10g dan tambahkan minyak peppermint kemudian dicampur hingga homogen.

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan Pasta Gigi

Bahan	Fungsi	Formulasi	Formulasi	Formulasi
		1	2	3
Bubuk Siwak	Zat aktif	3g	3g	3g
Carbopol 940	<i>Gelling agent</i>	1g	1,5g	2g
CaCO ₃	<i>Abrasive</i>	30g	30g	40g
Sakarin	Pemanis	0,2g	0,2g	0,2g
gliserin	Humectan	10g	10g	10g
MinyakPappermit	perasa	0,3g	0,3g	0,3g
Gom arab	Stabilizer	10g	10g	10g
Propil Paraben	Pengawet	0,02g	0,02g	0,02g
Na.Lauril Sulfat	Surfaktan	2g	2g	2g
Aquades add*	Pelarut	100ml	100ml	100ml

3.2.3 Pengambilan Bahan Baku

Pengambilan bahan baku batang siwak pada penelitian ini menggunakan bubuk siwak yang diperoleh dari Argo bibit tanaman serta bahan-bahan yang akan digunakan diperoleh dari Laboratorium Teknologi Farmasi FMIPA UII dan Laboratorium Biologi Farmasi FMIPA UII dan untuk bakteri *Streptococcus mutans* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sumatera Utara.

3.2.4 Determinasi Batang Siwak

Batang siwak digunakan pada penelitian ini dilakukan terlebih dahulu uji determinasi pada batang siwak yang telah dibeli agar memastikan kesesuaian dari batang siwak. Uji determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

3.2.5 Pengeringan Serbuk Siwak

Batang siwak yang diperoleh kemudian dicuci hingga bersih kemudian batang siwak dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 24 jam. Setelah batang siwak kering kemudian dilakukan proses pengeringan batang siwak dilakukan dengan cara dipotong kecil-kecil kemudian diserbukan dengan menggunakan alat muller machine lalu diayak menggunakan ayakan 50 msh dan 100 msh.

3.2.6 Pembuatan Formula Pasta Gigi

3.2.6.1 Rancangan Formula Pasta Gigi

Dibuat tiga formula pasta gigi yang mengandung bahan zat aktif bubuk siwak sebagai antibakteri, dan bubuk siwak masing-masing dengan konsentrasi 1%, CaCO₃ sebagai abrasive, carbopol 940 berfungsi sebagai pengikat dengan berbagai konsentrasi 1%, 1,5%, 2%, gliserin berfungsi sebagai humektan, CaCO₃ sebagai *abrasive*, minyak peppermint berfungsi sebagai pengaroma, propil paraben berfungsi sebagai pengawet, natrium auril sulfat berfungsi sebagai pembusa, dan akuades berfungsi sebagai pelarut (Oliii, 2013).

3.2.6.2 Pembuatan Bahan Pengikat

Pada proses pembuatan bahan pengikat Carbopol 940 mengembangkannya dalam air panas sedikit demi sedikit sambil diaduk terus menerus, hingga membentuk dan diaduk hingga homogen (Ismail et al.,2014).

3.2.6.3 Tahap Pencampuran

Proses pencampuran pasta gigi bubuk siwak terlebih dahulu dilakukan proses penimbangan semua bahan yang digunakan pada setiap formula, sakarin digerus di dalam cawan porselin, ditambahkan CaCO_3 , digerus hingga homogen, kemudian sebagian gliserin ditambahkan propil paraben diaduk hingga larut, natrium lauril sulfat ditambahkan sisa gliserin dicampurkan hingga homogen, kemudian dilarutkan ke dalam air secukupnya, setelah terbentuk kemudian ditambahkan carbopol diaduk hingga homogen, tambahkan bahan gom arab aduk hingga homogen kemudian ditambahkan bubuk siwak dan minyak peppermint diaduk hingga pembentukan pasta gigi (Dave et al.,2014).

3.2.7 Uji Fisik Formula Pasta Gigi

3.2.7.1 Uji Organoleptis

Pada proses uji organoleptis dilakukan untuk melihat tampilan fisik dari sediaan yang telah dibuat dengan cara melakukan pengamatan terhadap warna, bentuk, bau dan rasa uji ini dilakukan pada setiap minggunya selama 4 minggu (Febria et al., 2016).

3.2.7.2 Uji Daya Sebar

Sediaan pasta gigi diambil sebanyak 1gram pasta gigi diletakan di tengah kaca kemudain kaca yang lain yang telah ditimbang diletakan diatasnya dan biarkan selama 1 menit. Setelah itu proses selanjutya diatas kaca diletakan beban seberat 50mg dan didiamkan selama 1 menit, kemudian diukur diameter penyebarannya. Selanjutnya beban ditambahkan sebesar dua kali beban sebelumnya dan dibiarkan selama 1 menit, pada masing-masing 3 kali untuk tiap pasta gigi yang diperiksa. Uji daya sebar dilakukan selama 4 minggu (Elis et al., 2017).

3.2.7.3 Uji Pembusaan

Sediaan pasta gigi dilakukan uji pembentukan busa dilakukan dengan cara membuat larutan 1 gram dari berbagai konsentrasi pasta gigi bubuk siwak dalam air. Kemudian dimasukan kedalam gelas ukur berpenutup, lalu dikocok selama 1 menit. Kemudian mengukur tinggi busa yang terbentuk. Pengujian dilakukan setiap minggu selama 4 minggu penyimpanan (Afni et al., 2015).

3.2.7.4 Uji *Extrudability*

Uji dilakukan dengan memasukan sediaan pasta gigi yang sudah dibuat ke dalam tube pasta gigi. Penilaian terhadap kemudiam pasta gigi dikeluarkan dari tube dengan skala nilai 1 (sangat sulit dikeluarkan) sampai 4 (sangat mudah dikeluarkan) pengujian pertama dilakukan pada hari sediaan pasta gigi dibuat, kemudian di uji *extrudability* dan dilanjutkan pada minggu ke 4 untuk melihat hasilnya (Febria, et al., 2016).

3.2.8 Uji Stabilitas Formula Pasta Gigi

3.2.8.1 Uji Homogenitas

Homogenitas pasta gigi dilakukan dengan mengoleskan pasta gigi dilakukan pada plat kaca secara visual dengan mengamati ada atau tidaknya partikel-partikel pada kaca objek. Dioleskan pasta gigi pada kaca objek transparan dan kemudian antar kaca objek tersebut dilekatkan. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar yang terlihat pada kaca objek, proses pengujian homogenitas dapat dilakukan setelah selesai proses pembuatannya pada minggu ke-0 hingga setiap minggu sampai ke 4 minggu penyimpanan (Elis et al., 2017).

3.2.8.2 Uji Keasaman pH

Pengukuran pH dilakukan dengan cara mencelupkan alat pH meter kedalam sediaan pasta sampai menunjukkan angka yang konstan setelah beberapa saat. Nilai pH didapatkan dari angka tersebut. Pengujian dilakukan setelah proses pembuatannya pada minggu ke-0 hingga setiap minggu selama 4 minggu penyimpanan (Head et al., 2009).

3.2.8.3 Uji Viskositas

Penentuan uji viskositas menggunakan alat viscometer *Brookfield* spindel 64, dengan kecepatan 10 rpm. Sediaan pasta dimasukkan kedalam wadahnya. memasang spindel pada gantungan spindel kemudian menurunkan spindel sedemikian rupa hingga tercelup kedalam sampel. Dibiarkan spindel berputar dan dibaca angka yang ditunjukkan oleh jarum merah tersebut untuk menghitung viskositas. Pengujian dilakukan setelah proses pembuatannya pada minggu ke-0 hingga setiap minggu selama 4 minggu penyimpanan (Afni et al., 2015).

3.2.9 Uji aktivitas antibakteri

3.2.9.1 Sterilisasi Alat dan Bahan Uji Antibakteri

Proses preparasi Alat dan bahan yang akan digunakan harus disterilkan terlebih dahulu, sterilisasi dilakukan dengan cara yang sesuai terhadap masing-masing alat. Alat-alat yang disterilkan harus dalam keadaan bersih dan kering karena pada uji aktivitas antibakteri harus dilakukan dalam keadaan aseptis untuk menghindari kontaminasi. Alat-alat gelas berupa tabung reaksi, cawan petri ditutup mulutnya dengan kapas lalu aluminium foil, erlenmeyer, dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen dan disterilkan dengan melakukan pemanasan kering menggunakan oven pada suhu 160-180⁰C selama 15 menit atau dengan pemanasan basah menggunakan autoklaf. Alat dan bahan yang tidak tahan pemanasan kering seperti media, yellow tip, blue tip disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C tekanan 1 atm selama 15 menit (Afni et al., 2015).

3.2.9.2 Pembuatan Media Pertumbuhan MHA

Menimbang medium Nutrien Agar (NA) sebanyak 38 gram media dilarutkan dalam 1 liter aquadest, dan dipanaskan dengan microwave sampai mendidih dan larutan menjadi jernih untuk melarutkan media. Selanjutnya di sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Ditunggu suhu 45-50⁰C. Media yang sudah dituangkan kedalam cawan petri steril dan disimpan pada suhu 2-8⁰C (Wassel&Khattab, 2017).

3.2.9.3 Media Peremajaan Bakteri Agar Darah

Proses pembuatan Media agar darah digunakan untuk meremajakan bakteri *Streptococcus mutans* pembuatan dilakukan dengan menimbang media agar darah sebanyak 5 gram dilarutkan dalam 125 ml aquadest dipanaskan sampai mendidih. Kemudian disterilkan dalam autoklaf 121°C selama 15 menit. Lalu dicampurkan dengan darah manusia (golongan O) sebanyak 5cc, selanjutnya dimasukan diinkobator pada suhu 40-45°C media dituang didalam cawan petri, ditutup, dibiarkan membeku pada suhu ruangan (Isnarianti et al.,2013)

3.2.9.4 Pembiakan Bakteri *Streptococcus mutans*

Bakteri *Streptococcus mutans* dibiakan dengan menggunakan media agar darah dengan cara diinokulasi sebanyak 1-3 ose dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C (Deby et al., 2012).

3.2.9.5 Penyetaran Suspensi Bakteri

Bakteri uji yang ada pada media agar darah diambil dengan menggunakan kawat ose steril lalu disuspensikan dalam media MHB, selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C bertujuan untuk mendapatkan bakteri yang banyak, selanjutnya disetarakan kekeruhannya dengan standar *Mc Farland I* (10^8 CFU/ml), jika kekeruhannya belum setara maka ditambahkan larutan NaCl 0,9% sampai diperoleh tingkat kekeruhan yang sama (Wassel&Khattab, 2017)

3.2.9.6 Uji Aktivitas Antibakteri Pasta Gigi Bubuk Siwak

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan teknik aseptis. Media yang digunakan adalah Muller Hinton Agar (MHA), dilakukan dengan cara mengoleskan bakteri *Streptococcus mutans* secara merata pada media MHA. Selanjutnya dibuat 5 lubang sumuran. Pada masing-masing sumuran diberi pasta gigi serbuk siwak dengan konsentrasi carbopol 940 yang berbeda yaitu 1%, 1,5%, dan 2% dengan kontrol negatif ditambahkan pasta gigi tanpa siwak, kontrol positif ditambahkan dengan pasta gigi dengan merk X, dan untuk perlakuan diberikan pasta gigi formulasi 1, formulasi 2, dan formulasi 3, setelah semua bahan dimasukan kedalam masing-masing lubang sumuran, kemudian petridish diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, daerah bening atau zona hambat yang terbentuk pada media agar pada masing-masing sumuran yang diberi bahan penghambat atau pasta gigi bubuk

siwak. Pada media MHA pada masing-masing sumuran diukur diameter zona hambatnya (Afni et al., 2015).

3.3 Analisis Hasil

Analisis data yang diperoleh dari pengujian berbagai parameter tersebut dapat dilakukan dengan cara :

1. Pendekatan Diskriptif

Data hasil yang didapat dibuat dalam bentuk tabel dan penjelasan secara diskriptif tentang uji sifat fisik pasta gigi serbuk siwak yang dibandingkan dengan literatur.

2. Pendekatan Statistik

Analisis data dengan menggunakan metode statistik excel untuk menentukan hasil yang untuk melihat perbedaan sifat fisik dan aktivitas antibakteri dari beberapa formulasi sediaan pasta gigi bubuk siwak terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.