# Rancangan Penelitian

**BAB III METODE PENELTIAN**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian kualitatif dan kuantitatif menggunakan metode eksperimental yang meliputi pengambilan sampel, perajangan, pencucian, pengeringan bunga kecombrang, pembuatan serbuk bunga kecombrang untuk diformulasikan sediaan minuman instan granul dengan metode granulasi basah yang dilakukan dilaboratorium Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al Washliyah Medan.

# Variabel penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah simplisia bunga kecombrang, serbuk simplisia bunga kecombrang, konsentrasi simplisia bunga kecombrang, minuman instan granul serbuk simplisia bunga kecombrang dengan kombinasi xylitol, madu dan sukrosa (Optimum). Variabel terikat pada penelitian ini adalah karakterisitik fisik simplisia, metabolit sekunder, karakteristik fisik serbuk simplisia, aktivitas antibakteri, karakteristik fisik massa granul, aktivitas antibakteri.

# Parameter penelitian

Parameter penelitian yang digunakan pada penelitian ini meliputi Makroskopik, Mikroskopik, Kadar air, Kadar abu total, Kadar abu tidak larut asam dan Kadar sari larut air, Alkaloid, Flavonoid, Steroid/Tritepenoid, Tanin, Saponin dan glikosida simplisia. Mikromeritik, kelarutan dan organoleptis serbuk simplisia. Pewarnaan gram dan penentuan daya hambat. Organoleptis, penentuan laju alir, penentuan sudut diam, penentuan indeks tap, penentuan *moisture*

56

*content*, mikromeritik, penentuan waktu melarut, penentuan pH dan penentuan daya hambat.

# Jadwal dan Lokasi Penelitian

* + 1. **Jadwal penelitian**

Jadwal penelitian dilakukan mulai pada bulan januari 2024 hingga bulan juni 2024.

# Lokasi penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan.

# Bahan dan Peralatan

* + 1. **Bahan penelitian**

Bahan-bahan pada penelitian ini adalah serbuk simplisia bunga kecombrang, xylitol (HM FOOD), madu, sukrosa, mucilago amily, sodium starch glycolate (SSG), vanili (Harum) dan laktosa.

# Peralatan penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah: Lemari pengering, *beaker glass,* tabung reaksi*,* batang pengaduk, timbangan analitik, lemari asam, *hot plate,* corong kaca, erlenmeyer, kertas saring, kertas perkamen, tanur, tang krus, cawan krus, desikator, gelas ukur (PYREX), *shieve shaker* (B-ONE MAS 208 S), *water bath*, *Moisture Determination balance* (Kett FD-660)*,* lumpang dan alu, ayakan mesh 12, ayakan mesh 16, blender, *statif, ring clem*, penggaris, cawan petri, *laminar air flow* (BIOBASE), oven (MEMMERT dan VEVOR), inkubator (MEMMERT), autoklaf dan kulkas.

# Pembuatan Larutan Pereaksi

* + 1. **Pereaksi HCl 2N**

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat diencerkan dengan air suling sampai 100 ml (Depkes RI, 1995).

# Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,569 g raksa (II) klorida dilarutkan dalam air suling hingga 100 ml. pada wadah lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodide lalu dilarutkan dalam 10 ml air suling. Kedua larutan dicampurkan dan tambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 ml (Depkes RI, 1995).

# Pereaksi Bouchardat

Sebanyak 4 g kalium iodide dilarutkan dalam air suling secukupnya kemudian ditambahkan 2 g iodium sedikit demi sedikit cukupkan dengan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

# Pereaksi Dragendorf

Sebanyak 0,8 g bismut (III) nitrat dilarutkan dalam asam nitrat pekat 20 ml kemudian dicampurkan dengan kalium iodide sebanyak 27,2 g dalam 50 ml air suling. Campuran didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan diencerkan dengan air secukupnya hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

# Pereaksi Liebermann-Burchard

Sebanyak 5 bagian volume asam sulfat pekat dicampurkan dengan 50 bagian volume etanol 95%, lalu ditambahkan dengan hati-hati 5 bagian volume asam asetat anhidrida ke dalam campuran tersebut dan didinginkan (Depkes RI, 1995).

# Perekasi Besi (III) Klorida

Sebanyak 1 g besi (III) klorida dilarutkan dalam air suling sampai 100 ml (Depkes RI, 1995).

# Pereaksi Timbal (II) Asetat

Ditimbang sebanyak 15,17g timbal (II) asetat dan dilarutkan dalam air suling bebas CO2 hingga 100 ml, disimpan dalam wadah bertutup rapat (POM, 1979).

# Pereaksi Molish

Ditimbang sebanyak 3g α-naftol dan dilarutkan dalam asam nitrat 0,5N hingga 100 ml, disimpan dalam wadah bertutup rapat (POM, 1979).

# Persiapan Sampel

* + 1. **Pengumpulan sampel**

Sampel bagian tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Bunga Kecombrang yang diperoleh dari Pasar Raya MMTC di Jalan Kenangan Baru, Kec. Percut Sei Tuan, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara.

# Identifikasi sampel

Identifikasi sampel dilakukan di *Herbarium Medanense* (MEDA) Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara Medan.

# Pengolahan sampel

Bunga kecombrang dipotong, dicuci, ditiriskan, dan diangin-anginkan setelah dibersihkan dari pengotornya. Kemudian dikeringkan di dalam lemari pengering hingga kering. Kemudian dipotong halus dan diblender hingga menjadi serbuk. Lalu serbuk diayak, Serbuk yang keluar dari ayakan *mesh* 40 kemudian dimasukkan ke dalam wadah tertutup yang rapat dan kering (Dewa et al., 2024).

# Karakterisasi Fisik Simplisia

* + 1. **Makroskopik**

Uji makroskopik akan dilakukan pada simplisia bunga kecombrang secara visual, seperti melihat bentuk maupun ukuran sampel (Handayani et al., 2019).

# Mikroskopik

Uji mikroskopik dilakukan dengan cara meletakan simplisia di atas *object glass* kemudian ditetesi kloralhidrat dan selanjutnya ditutup dengan *cover glass* lalu difiksasi di atas lampu spiritus, setelah difiksasi diamati dengan menggunakan mikroskop dan melihat fragmen pengenal pada tumbuhan (Handayani et al., 2019).

# Kadar air

Uji kadar air pada penelitian ini menggunakan metode gravimetri. Timbang sampel lebih kurang 2 g, masukkan kedalam wadah yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105℃ selama 5 jam, dan timbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang pada selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Kemenkes, 2017).

# Kadar abu total

Simplisia dan ekstrak masing-masing sebanyak 2 g ditimbang dan dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara, pijarkan perlahan- lahan hingga suhu yang menyebabkan senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sampai tinggal unsur mineral dan anorganik saja yaitu pada suhu 600 ± 25°C, dinginkan dan timbang. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Kemenkes, 2017).

# Kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 ml asam klorida encer LP selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam

dikumpulkan, saring melalui kertas saring bebas abu, Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Kemenkes, 2017).

# Kadar sari larut air

5 gram simplisia dimaserasi dengan menggunakan 100 ml air kloroform (2,5 ml kloroform dalam air suling 97,5 ml) selama 24 jam dalam wadah tertutup sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama dan diamkan selama 18 jam kemudian disaring. Sebanyak 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan porselen yang sudah ditara. Diuapkan diatas penangas air sampai kering, sisa filtrat dipanaskan dalam oven dengan suhu 105℃ hingga diperoleh bobot konstan (Muslihin & Budiyanto, 2022). Dihitung % kadar sari larut air.

% Kadar sari larut air =  x  x 100 %

# Kadar sari larut etanol

5 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan menggunakan 100 ml etanol (70%) selama 24 jam menggunakan erlenmeyer sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian diamkan selama 18 jam, disaring. Diukur filtrat sebanyak 20 ml lalu diuapkan hingga kering dengan menggunakan cawan porselen yang telah ditara, dipanaskan sisa filtrat menggunakan oven dengan suhu 105°C hingga diperoleh bobot tetap (Muslihin & Budiyanto, 2022). Dihitung kadar % sari larut etanol.

% Kadar sari larut etanol =  x  x 100 %

# Skrining Fitokimia

* + 1. **Alkaloid**

Serbuk sebanyak 0,5 g ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml aquadest, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, dinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk uji alkoloid. Diambil 3 tabung reaksi, masing-masing tabung dimasukkan 0,5 ml filtrat. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer, bouchardat dan dragendorf. Hasil positif mengandung senyawa alkoloid jika terjadi endapan. Apabila 2 dari 3 pereaksi di atas positif mengandung senyawa alkoloid maka sampel dinyatakan mengandung alkaloid yaitu terbentuknya endapan putih atau kuning. (Handayani et al., 2019).

# Flavonoid

Serbuk simplisia sebanyak 1 gram ditambahkan 10 ml air panas lalu didihkan selama 5 menit, disaring dalam keadaan masih panas. Fitrat yang diperoleh diambil sebanyak 5 ml, ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium, 1 ml HCl dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Hasil positif mengandung senyawa flavonoid jika terjadi perubahan warna merah kuning pada filtrat atau warna jingga merah pada lapisan amil alkohol. (Handayani et al., 2019).

# Steroid/Triterpenoid

Serbuk simplisia sebanyak 0,5 g dimaserasi dengan 10 ml N-heksan selama 1 jam lalu disaring. Filtrat yang diperoleh diuapkan, sisa filtrat ditambahkan dengan 10 tetes pereaksi asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Diamati perubahan yang terjadi, apabila serbuk positif mengandung senyawa terpenoid/steroid maka akan ditandai dengan terbentuknya warna ungu atau merah yang berubah menjadi biru kehijauan. (Handayani et al., 2019).

# Tanin

Simplisia atau ekstrak digerus dan dipanaskan dengan air, kemudian saring. Ambil 2 ml filtrat, Tetesi dengan pereaksi besi (III) klorida. Adanya senyawa tanin menyebabkan filtrat berwarna biru kehitaman. (Bachtiar roesman kamiel, Susanti, 2022).

# Saponin

Sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan dan kemudian dikocok kuat secara vertical selama 10 detik. Terbentuk busa atau buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1- 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N busa atau buih tidak hilang (I. G. A. A. K. Wardani, 2020).

# Glikosida

Sari 3 g serbuk simplisia dengan 30 ml campuran 7 bagian volume etanol (96%) P dan 3 bagian volume air dalam air pendingin alir balik selama 10 menit, dinginkan, saring. Pada 20 ml filtrat tambahkan 25 ml air dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M, kocok, diamkan selama 5 menit, saring. Sari filtrat 3 kali, tiap kali dengan 20 ml campuran 3 bagian volume kloroform P dan 2 bagian volume isopropanol P. Pada kumpulan sari tambahkan natrium sulfat anhidrat, saring, dan uapkan pada suhu tidak lebih dari 50℃. Larutkan sisa dengan 2 ml methanol P. Masukkan 0,1 ml larutan percobaan dalam tabung reaksi, uapkan di atas penangas air. Pada sisa tambahkan 2 ml air dan 5 tetes Molish LP. Tambahkan hati-hati 2 ml asam sulfat P, terbentuk cincin berwarna ungu pada batas cairan, menunjukkan adanya ikatan gula (reaksi Molish) (Depkes RI, 1989).

# Karakterisasi Fisik Serbuk Simplisia

* + 1. **Mikromeritik**

Masukkan 25 g simplisia bunga kecombrang kedalam nomor ayakan paling kecil dan tutup. Goyang pengayak dengan arah putaran horizontal dan ketukkan secara vertikal pada permukaan yang keras selama tidak kurang dari 20 menit menggunakan alat *shieve shaker*. Timbang saksama jumlah yang tertinggal pada pengayak dan dalam wadah penampung (Depkes RI, 2020).

# Kelarutan

Serbuk simplisia bunga kecombrang sebanyak 2,5 gram dikocok dalam 80 ml air selama 10 menit, disaring dengan menggunakan kertas saring kedalam erlenmeyer yang telah ditara (W1), uapkan diatas penangas air hingga kering, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105℃ selama 15 menit 1 jam, kemudian didinginkan dan ditimbang (W2) (Depkes RI, 1995). Perbedaan berat antara residu dan erlenmeyer kosong tidak boleh lebih dari 12,5 mg (0,25%). Zat larut air (Za) dihitung berdasarkan persamaan berikut:

Za= x 100%

# Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengambil serbuk simplisia dengan melihat bentuk, rasa, bau, dan warna (Sriarumtias et al., 2023).

# Uji Aktivitas Antibakteri Serbuk Simplisia Bunga Kecombrang

* + 1. **Identifikasi Bakteri Metode Pewarnaan Gram**

Kaca preparat dibersihkan dengan alkohol 70%. Jarum ose dipijarkan kemudian ditunggu hingga dingin, lalu bakteri diambil dari media lalu diratakan di atas preparat glass. Kaca preparat dipijarkan hingga kering. Larutan zat warna kristal violet diteteskan sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Preparat diberikan akuades mengalir dan dikeringkan. Larutan Iodin diteteskan

dan dibiarkan selama 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir dan keringkan. Larutan alkohol diberikan selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan safranin diberikan selama 20 detik. Dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x (Tantular et al., 2017).

* + 1. **Uji Daya Hambat *Streptococcus mutans***

Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode *disc diffusion* (tes Kirby- Bauer). Suspensi bakteri uji dituang pada media MHA yang telah mengeras sebanyak 0,1 ml, kemudian diratakan dan diamkan hingga kering. Seluruh sampel dari berbagai konsentrasi (6,25; 12,5; 25 dan 50%) masing-masing dilarutkan terlebih dahulu dengan DMSO. Kertas cakram direndam ke dalam masing-masing konsentrasi selama 15 menit kemudian diletakkan pada permukaan media secara aseptik. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24 – 48 jam. Aktivitas antibakteri dinyatakan positif apabila terbentuk zona hambat berupa zona bening disekeliling kertas cakram (Shafira et al., 2023).

# Pembuatan Granul Instan Bunga Kecombrang

* + 1. **Penentuan Formulasi Granul Instan Bunga Kecombrang**

Pada penelitian ini dilakukan penentuan formulasi granul instan dengan menggunakan zat aktif bunga kecombrang kemudian ditambah dengan bahan pemanis dengan konsentrasi berbeda, bahan pengaroma, bahan penghancur seperti yang tertera pada tabel 3.1 dibawah ini.

# Tabel 3.1 Komposisi Granul Instan Bunga Kecombrang

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Bahan** | **Formula (%b/b)** | **Fungsi** |
| Serbuk Bunga Kecombrang | 12,5 | Zat Aktif |
| Xylitol | 9,6-10 | Pemanis |
| Madu | 5,6-6 | Pemanis |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Sukrosa | 5-5,4 | Pemanis |
| Mucilago Amily 30% | 10 | Pengikat |
| SSG | 4 | Penghancur |
| Vanili | 1 | Pengaroma |
| Laktosa ad | 100 gr | Pengisi |

Komposisi zat aktif serbuk bunga kecombrang yang digunakan yaitu 12,5%, kemudian mucilago amily 30% dengan konsentrasi 10% yang digunakan sebagai bahan pengikat. Bahan penghancur yang digunakan dalam granul instan bunga kecombrang adalah sodium starch glycolate (SSG) dengan konsentrasi 4%. Vanili digunakan sebagai bahan pengaroma dengan memakai konsentrasi 1%. Bahan pengisi pada granul instan bunga kecombrang yang dipakai adalah laktosa dengan ad 100 gr. Pemanis pada granul instan bunga kecombrang yang digunakan adalah xylitol, madu dan sukrosa memakai rentang konsentrasi yang berbeda. Xylitol digunakan konsentrasi berbeda dalam rentang 9,6-10%. Madu digunakan konsentrasi berbeda dengan rentang 5,6-6%. Sukrosa yang digunakan dengan konsentrasi berbeda dengan rentang 5-5,4%. kemudian data rentang komposisi di input ke dalam aplikasi sofware *Design Expert®* versi 13.

* + 1. **Optimasi Formulasi Menggunakan *Simplex Lattice Design***

Optimasi formula granul instan dilakukan dengan menggunakan software *Design Expert®* versi 13 dimana nilai *lowe*r dan *upper limit* dari Xylitol, Madu dan Sukrosa dimasukkan kedalam software sehingga diperoleh sebanyak 6 run formula. formula dibuat sesuai variasi yang ditentukan oleh software dan kemudian formula yang didapat dibuat secara konvensional.

# Tabel 3.2 Formulasi Granul Instan

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Komposisi** | **Run (%b/b)** | | | | | |
| **I** | **II** | **III** | **IV** | **V** | **VI** |
| Zat Aktif | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 |
| Sukrosa | 5,4 | 5,4 | 5,2 | 5 | 5,4 | 5,2 |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Xylitol | 9,6 | 10 | 10 | 10 | 9,8 | 9,8 |
| Madu | 6 | 5,6 | 5,8 | 5,6 | 5,8 | 6 |
| Mucilago amily 30% | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| SSG | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Essence Vanilla | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laktosa ad | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

**\*Berat Total**: 100 gr/Run

# Prosedur Pembuatan Minuman Instan Granul Bunga Kecombrang

Pembuatan granul instan dilakukan dengan cara metode granulasi basah. Persiapkan alat dan bahan yang akan digunakan, kemudian gerus Xylitol, Sukrosa dan Vanili didalam lumpang hingga halus. Kemudian masukkan serbuk simplisia bunga kecombrang, Sodium Starch Glycolate (SSG) dan Laktosa gerus hingga homogen. Lalu masukkan Mucilago amily dan Madu gerus hingga membentuk masa liat. Kemudian ayak menggunakan *mesh* 14 dan dikeringkan dilemari pengering selama 2-3 hari, Setelah granul kering diayak kembali menggunakan *mesh* 16. Setelah itu dilakukan uji fisik massa granul sebagai berikut:

# Mutu Fisik Massa Granul

* + 1. **Organoleptis**

Uji organoleptis dilakukan dengan mengambil granul dengan melihat bentuk, rasa, bau, dan warna (Sriarumtias et al., 2023).

# Laju Alir

Pengujian dilakukan seperti pada pengujian sudut diam, waktu alir ditentukan dengan menggunakan *“stopwatch”* dihitung pada saat granul mulai mengalir hingga granul berhenti mengalir (Tungadi, R., & Apt, 2018).

# Sudut Diam

Granul/sampel yang telah kering ditimbang sebanyak 20 gram, kemudian dimasukkan ke dalam corong yang lubang bawahnya ditutup, kemudian diratakan permukaannya. Pada bagian corong diberi alas, tutup bawah corong dibuka sehingga granul dapat mengalir ke atas meja yang telah dilapisi kertas grafik. Diukur tinggi dan garis tengah dasar timbangan granul yang terbentuk sudut diam

dihitung dengan rumus: Tan α = 

Diketahui: α = sudut diam

h = tinggi timbunan

d = diameter timbangan granul (Tungadi, R., & Apt, 2018).

# Indeks Tap

Sebanyak 20 gram granul dimasukkan kedalam gelas ukur 100 ml / 50 ml dan dicatat volumenya (Vo) kemudian dilakukan pengetukan dengan alat dan dicatat volume ketukan ke 20 dengan interval waktu 2 detik. Ukur volume granul setelah dimampatkan dan dihitung bobot jenis granul (Tungadi, R., & Apt, 2018).

* + 1. ***Moisture Content***

Pengujian kelembaban granul dilakukan dengan menggunakan alat *moisture analyzer*. Terlebih dahulu dinyalakan alat *moisture analyzer* ditimbang 1g granul kemudian dimasukan granul kedalam alat *moisture analyzer* ditunggu hingga alat berbunyi dan lampu dari alat mati yang menunjukan proses telah selesai, Diulangi pengujian sebanyak tiga kali. Catat hasil dari pengujian kelembaban granul (Cheiya et al., 2023).

# Mikromeritik

Masukkan 25 g granul instan kedalam nomor ayakan paling kecil dan tutup. Goyang pengayak dengan arah putaran horizontal dan ketukkan secara

vertikal pada permukaan yang keras selama tidak kurang dari 20 menit menggunakan alat *shieve shaker*. Timbang saksama jumlah yang tertinggal pada pengayak dan dalam wadah penampung (Depkes RI, 2020).

# Uji Waktu Melarut

Pengujian waktu melarut granul bertujuan untuk melihat kemampuan melarut dari 5 gram granul dalam air hangat volume 100 mL yang mewakili penggunaan granul pada masyarakat dengan persyaratan ≤ 5 menit (Rustiani & Hidayat, 2023).

# Uji pH

Ditimbang granul sebanyak 5 gram dan dilarutkan menggunakan 100 mL air, kemudian diukur pH menggunakan alat pH meter dan dicatat nilai pH yang didapatkan.Nilai pH yang dipersyaratkan pada larutan atau minuman yaitu 6-7 (Pratama et al., 2024).

# Uji Aktivitas Antibakteri Formula Optimum Granul Instan

* + 1. **Pembuatan Larutan NaCl 0,9 %**

Sebanyak 0,9 g NaCl dilarutkan kedalam 100 mL akuades dan disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Larutan NaCl siap digunakan.

# Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi koloni uji *Streptococcus mutans* dibuat dengan cara mengambil satu ose koloni dari media NA padat ke tabung reaksi berisi 5 mL NaCl 0,9%. Kekeruhan pada suspensi koloni uji distandarisasi dengan standar 0,5 McFarland (sekitar 1,5 x 108 CFU/mL). Suspensi harus digunakan sebagai inokulum dalam waktu 15 menit (Nurhayati et al., 2020).

# Pembuatan Larutan Pembanding Mc Farland 0,5

Larutan Mc Farland dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji. Larutan Mc Farland 0,5 dibuat dengan melarutkan larutan BaCl2 1 % sebanyak 0,05 ml dan larutan H2SO4 1 % sebanyak 9,95 ml. Larutan kemudian di vortex sampai tercampur sempurna (Amanda Rizki et al., 2021).

# Pembuatan Media Mueller Hilton Agar (MHA)

Ditimbang media MHA 38 gr menggunakan neraca analitik kemudian dilarutkan dalam 1 liter aquadest. Media dipanaskan sampai larut. Kemudian disteril dalam autoklaf suhu 121oC selama 15 menit (Ariami et al., 2017).

# Prosedur Inokulasi Bakteri

Inokulasi bakteri adalah menumbuhkan bakteri dalam cawan petri pada media agar yang telah dibuat. Pembuatan stok bakteri ini dilakukan untuk peremajaan dan memperbanyak bakteri. Diambil 1 ose bakteri dan digoreskan dimedia agar, lalu diinkubasi dalam inkubator suhu 37° C selama 24 jam (Amanda Rizki et al., 2021).

* + 1. **Uji Daya Hambat *Streptococcus mutans***

Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode *disc diffusion* (tes Kirby- Bauer). Suspensi bakteri uji dituang pada media MHA yang telah mengeras sebanyak 0,1 ml, kemudian diratakan dan diamkan hingga kering. Granul instan, dan kontrol positif dilarutkan terlebih dahulu dengan DMSO. Kontrol positif yang digunakan adalah SP Troches yang mengandung Dequalinium Chloride 0,25 mg dengan pelarut/control negatif yang dipakai adalah DMSO. Kertas cakram direndam ke dalam larutan granul instan, larutan kontrol positif dan larutan

control negatif selama 15 menit kemudian diletakkan pada permukaan media secara aseptik. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24 – 48 jam. Aktivitas antibakteri dinyatakan positif apabila terbentuk zona hambat berupa zona bening disekeliling kertas cakram (Shafira et al., 2023).