BAB III

**METODOLOGI PENELITIAN**

## 3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental, untuk memformulasikan sediaan pasta gigi dari daging lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm.f.). Adapun rancangan penelitian ini dari persiapan penelitian, pencucian sampel hingga pengekstrakan sampel, formulasi sediaan pasta gigi daging lidah buaya dan uji evaluasi sediaan.

## 3.2 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat dua jemis variabel penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah daging lidah buaya. Variabel terikat pada penelitian ini adalah evaluasi mutu fisik sediaan pasta gigi daging lidah buaya.

## 3.3 Parameter Penelitian

Parameter penelitian pada penelitian ini adalah uji parameter standar daging lidah buaya (kadar air, kadar abu total, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut dalam etanol dan kadar abu tidak larut asam), uji mutu fisik (organoleptis, pH, homogenitas, daya sebar, daya lekat, tinggi busa dan viskositas) dan uji antibakteri.

## 3.4 Lokasi dan Jadwal Penelitian

### 3.4.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di dua tempat yaitu, Laboratorium Mikrobiologi & Virologi Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan.

## 3.5 Jadwal Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari – Juni 2023

## 3.6 Alat dan Bahan

### 3.6.1 Alat

Alat yang digunakan adalah *autoklave* (B- One), *inkubator* (memmert)*, oven* (memmert)*, blender* (Miyako)*, waterbath, moisture analizer,* gelas ukur, corong glass, erlenmeyer, bunsen, jangka sorong digital, vortex, hotplate, *Laminar Air Flow* (LAF), tabung reaksi,plastik wrap, gunting, mancis, cawan petri, jarum ose, beaker glass, timbangan gram kasar dan halus, neraca analitik, anak timbangan, mortir, stanfer, sudip, cawan porselin, batang pengaduk, kertas perkamen, pot plastik, pH meter, viskometer, mikroskop, objek glass, penggaris, sendok tanduk, blue tip, yellow tip, mikro meter,kertas saring, tabung reaksi, alumunium foil, kassa steril, kapas steril, benang wol, tissu, sarung tangan steril pipet tetes, wadah pasta gigi, pena, dan lemari es.

### 3.6.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah lidah buaya segar yang akan diambil sarinya (*Aloe vera* (L.) Burm.f.), media *Nutrient Agar* (NA), suspensi standart *Mc. Farland*, larutan NaCl steril 0,9%, air suling panas, Na CMC (*Carboxy Methyl Cellulosa*), Kalsium karbonat, Gliserin, Natrium lauril sulfat, OMP (*Oleum Menthae Piperatea*)*,* Aquadest, Larutan pereaksi Bouchardat, larutan pereaksi Dragendorff, Larutan pereaksi Mayer, Larutan pereaksi Molish, Larutan pereaksi Lieberman-Buchard, asam klorida, serbuk Magnesium, (Mg), Hcl (p),amil alkohol, besi (III) klorida, Hcl 2N, *n*-heksana, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, timbal (II) asetat 0,4 M, kloroform dan isopropanolol.

## 3.7 Pengumpulan Data dan Prosedur Penelitian

### 3.7.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *purposive*, yaitu pengambilan tanpa membandingkan dengan daerah lain. Bagian tumbuhan yang digunakan yaitu daging lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm.f.) yang di ambil dari daerah sekitaran Medan.

### 3.7.2 Identifikasi Tumbuhan

Identifikasi atau determinasi sampel dilakukan di *Herbarium Medanese* (MEDA) Departemen Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara Jalan Bioteknologi no.1 Kampus USU, Medan.

### 3.7.3 Penyiapan Sampel

Lidah buaya dicuci terlebih dahulu dan dihilangkan durinya, kemudian dipotong dan dikupas. Setelah itu, dihaluskan dengan blender dan diperoleh jus lidah buaya (Dewi, 2019).

## 3.8 Pembuatan Larutan Pereaksi

### 3.8.1 Larutan Pereaksi HCL (e)

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat dimasukkan ke dalam beaker glass dan dicukupkan dengan aquadest sampai 100 ml (Depkes RI, 1979).

### 3.8.2 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat dimasukkan ke dalam beaker glass dan dicukupkan dengan aquadest sampai 100 ml (Depkes RI, 1995).

### 3.8.3 Larutan Pereaksi Mayer

Ditimbang HgCl₂ (Raksa (ii) Klorida) sebanyak 1,5 gram dilarutkan dengan 60 ml aquadest. Di tempat lain dilarutkan KI sebanyak 5 gram dalam 10 ml aquadest. Kedua larutan yang telah dibuat tersebut kemudian dicampur dan diencerkan dengan aquadest sampai volume 100 ml. Pereaksi Mayer yang diperoleh selanjutnya disimpan dalam botol gelap (Depkes RI, 1989).

### 3.8.4 Larutan Pereaksi Bouchardat

Sebanyak 4 gram kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml aquadest, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 gram iodium dan dicukupkan dengan aquadest hingga 100 ml (Ditjen POM, 1995).

### 3.8.5 Larutan Pereaksi Dragendorff

Ditimbang Bismuth subnitrat sebanyak 0,85 gram dilarutkan dalam campuran 10 ml asam asetat glasial dan 40 ml aquadest. Di tempat lain 8 gram KI dilarutkan dalam 20 ml aquadest. Kedua larutan yang telah dibuat dicampur kemudian diencerkan dengan aquadest sampai volumenya 100 ml (Depkes RI, 1995).

### 3.8.6 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%

Sebanyak 1 gram besi (III) klorida dilarutkan dengan aquadest hingga 100 ml (Ditjen POM, 1995).

### 3.8.7 Larutan Pereaksi Liebermann-Burchard

Asam asetat anhidrat sebanyak 20 ml dipipet lalu dicampurkan dengan 1 ml asam sulfat pekat dalam beker glass (Depkes RI, 1995).

## 3.9 Uji Karakterisasi Simplisia

Pemeriksaan karakterisasi meliputi pemeriksaan makroskopik, pemeriksaan mikroskopik, penetapan kadar air dengan metode azeotropi, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu total, dan penetapan kadar abu tidak larut asam (Depkes RI, 1995).

### 3.9.1 Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan pengamatan secara langsung dan segar untuk menentukan ciri khas daging lidah buaya berdasarkan bentuk dan warna daging lidah buaya (Mayasari, 2018).

### 3.9.2 Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan dengan pengamatan di bawah mikroskop terhadap daging lidah buaya dan diamati fragmen pengenal dari daging lidah buaya secara umum (Depkes RI, 1978).

### 3.9.3 Penetapan Kadar Air

1. Uji Kadar Air

Dimasukkan 200 ml toluena dan 2 ml air suling ke dalam labu destilasi , alat (azeotrop) dan lakukan destilasi selama 2 jam. Hentikan apabila semua air sudah terdestilasi. Dibiarkan mendingin selama 30 menit, dan baca volume air dengan ketelitian 0,05 ml (v1), maka diperoleh toluen jenuh. Diambil sedikit untuk membilas alat. Ke dalam labu tersebut dimasukkan sebanyak 5 gram daging lidah buaya , lalu dipanaskan labu perlahan lahan selama 15 menit dan apabila toluen mulai mendidih , suling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes per detik sampai sebagian air tersuling, kemudian naikkan kecepatan penyulingan hingga lebih kurang 4 tetes per detik. Bila semua air telah tersuling, bilas bagian dalam tabung dengan toluen lanjutkan penyulingan selama 5 menit, lalu hentikan pemanasan dan diamkan pada suhu kamar. Baca volume air dan toluen yang memisah sempurna (v2). Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa, hitung persentase yang ada dalam zat (Depkes RI,1995).

* Tujuannya adalah untuk memberikan batasan minimal atau rentang besarnya kandungan air di dalam ekstrak tersebut (Ditijen POM, 2000).
* Rumus perhitungan penetapan kadar air:

% kadar air ekstrak =

### 3.9.4 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air

Sebanyak 5 gram daging lidah buaya yang telah ditimbang, dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml campuran air-kloroform (2,5 ml kloroform dalam air suling sampai 1 L). Di dalam labu erlenmeyer tertutup sambil dikocok, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring, lalu diambil 20 ml filtrat dan diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang telah dipanaskan dan ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105℃ sampai bobot nya tetap. Hitung persen kadar sari yang larut dalam air terhadap bahan yang dikeringkan (Depkes RI, 1995).

Tujuannya adalah untuk memberikan gambaran kadar persentase senyawa yang dapat tersari dengan menggunakan pelarut air dalam suatu daging lidah buaya (Depkes RI, 2000).

Rumus perhitungan penetapan kadar sari larut dalam air:

Kadar sari larut air =

### 3.9.5 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol

Sebanyak 5 gram daging lidah buaya yang telah ditimbang, dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml etanol 96%. Di dalam labu erlenmeyer tertutup sambil dikocok, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring, lalu diambil 20 ml filtrat dan diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang telah dipanaskan dan ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105℃ sampai bobotnya tetap. Hitung persen kadar sari yang larut dalam etanol terhadap bahan yang dikeringkan (Depkes RI, 1995).

Tujuannya adalah untuk memberikan gambaran kadar persentase senyawa yang dapat tersari dengan menggunakan pelarut etanol dalam suatu daging lidah buaya (Depkes RI, 2000).

Rumus perhitungan penetapan kadar sari larut dalam etanol:

Kadar sari larut dalam etanol =

### 3.9.6 Penetapan Kadar Abu Total

Ditimbang daging lidah buaya sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam krus porselin yang telah dipijar dan ditara, kemudian di ratakan. Lalu krus dipijarkan perlahan-lahan pada suhu lebih kurang 600℃ sampai arang habis dan berbentuk debu, kemudian di dinginkan dan ditimbang hingga bobot tetap, kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah di keringkan di udara (Ditjen POM, 1989).

Rumus perhitungan penetapan kadar abu total:

Kadar abu total =

### 3.9.7 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu di didihkan dalam 25 ml asam klorida encer 2N selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, dan disaring melalui kertas saring bebas abu, lalu dicuci dengan air panas. Kemudian residu dan kertas saring dipijarkan sampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995).

Tujuannya untuk mengetahui jumlah kadar abu yang diperoleh dari faktor eksternal, berasal dari pengotor, pasir atau tanah (Depkes RI, 2000).

Rumus perhitungan penetapan kadar abu tidak larut asam:

Kadar abu tidak larut asam =

## 3.10 Skrining Fitokimia Daging Lidah Buaya

### 3.10.1 Pemeriksaan Alkaloida

Ditimbang 0,5 gram daging lidah buaya, kemudian masing-masing ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air, panaskan diatas penangas air selama 2 menit, kemudian dinginkan dan disaring. Filtrat digunakan untuk pemeriksaan alkaloida. Diambil 3 tabung reaksi, lalu ke dalam masing-masing tabung reaksi dimasukkan filtrat sebanyak 0,5 ml. Kemudian untuk masing-masing sampel, pada tabung pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, pada tabung kedua ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardard, pada tabung ketiga ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff. Alkaloida disebut positif jika terbentuk endapan paling sedikit dua dari tiga percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

### 3.10.2 Pemeriksaan Tanin

Ditimbang 1 gram daging lidah buaya, kemudian ditambahkan 10 ml aquadest lalu disaring. Filtrat diencerkan dengan aquadest sampai tidak bewarna. Diambil 2 ml hasi pengenceran. Ditambahkan dengan 1-2 tetes besi (III) klorida. Terjadi warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Marjoni, 2016).

### 3.10.3 Pemeriksaan Saponin

Ditimbang 0,5 gram daging lidah buaya, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 10 ml air panas, dinginkan dan kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm dan dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N buih tidak hilang, menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1978).

### 3.10.4 Pemeriksaan Flavonoida

Ditimbang sebanyak 10 gram daging lidah buaya, ditambahkan dengan 10 ml air panas. Didihkan campuran selama 5 menit, disaring ketika panas. Sebanyak 5 ml filtrat yang diperoleh, ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg, 1 ml HCL pekat, dan 2 ml amil alkohol, dikocok, dan dibiarkan memisah. Sampel menunjukkan positif flavonoida jika terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Marjoni, 2016).

### 3.10.5 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Ditimbang sebanyak 1 gram daging lidah buaya, dimaserasi dengan n-heksan selama 2 jam, lalu saring. Diambil filtrat kemudian diuapkan dengan cawan penguap. Ditambahkan pereaksi Lieberman Buchard pada sisa yang diuapkan. Jika terbentuk warna biru atau hijau menunjukkan positif steroid dan jika timbul warna merah, pink atau ungu menunjukkan positif triterpenoid (Marjoni, 2016).

### 3.10.6 Pemeriksaan Glikosida

Ditimbang sebanyak 3 gram daging lidah buaya, kemudian disari dengan 30 ml campuran 7 bagian volume etanol 96% dan 3 bagian volume aquadest (7:3). Direfluks selama 10 menit, didinginkan dan disaring. Pada 20 ml filtrat ditambahkan 25 ml air dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok, diamkan selama 5 menit, lalu disaring. Disari filtrat 3 kali, tiap kali dengan 20 ml campuran 3 bagian volume kloroform dan 2 bagian volume isopropanolol. Pada kumpulan sari ditambahkan natrium sulfat anhidrat, disaring, diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50°C, kemudian dilarutkan sisanya dengan 2 ml metanol, diambil 0,1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi diuapkan di atas penangas air, ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes pereaksi molish. Ditambahkan 2 ml asam sulfat pekat perlahan-lahan melalui tabung ,terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas kedua cairan , menunjukkan adanya komponen gula (glikon) (Depkes RI,1989).

## 3.11 Prosedur Penelitian

### 3.11.1 Formulasi Sediaan Pasta Gigi Daging Lidah Buaya (*Aloe vera* (L.) Burm.f.)

Formulasi sediaan pasta gigi daging lidah buaya dapat dilihat pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1** Formulasi Sediaan Pasta Gigi Daging Lidah Buaya

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Bahan** | **Formulasi** | | | | **Kegunaan** |
| Kontrol negatif | FI  (%) | FII  (%) | FIII  (%) |
| Daging Lidah Buaya | - | 10 | 30 | 50 | Zat Aktif |
| Na-CMC | 5 | 5 | 5 | 5 | Bahan Pengikat |
| Kalsium Karbonat | 40 | 40 | 40 | 40 | Bahan Abrasif |
| Gliserin | 10 | 10 | 10 | 10 | Pelembab |
| Natrium Lauryl Sulfat | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | Detergen Pembuat Busa |
| *Oleum Menthae Piperitae* (OMP) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | Perasa |
| Natrium Benzoat | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | Bahan Pengawet |
| Aquadest | ad100 | ad100 | ad100 | - | Pelarut |

**Keterangan :**

Kontrol Negatif : Formulasi sediaan pasta gigi tanpa daging lidah buaya 0

FI : Formulasi sediaan pasta gigi dengan daging lidah buaya konsentrasi 10%

FII : Formulasi sediaan pasta gigi dengan daging lidah buaya konsentrasi 30%

FIII : Formulasi sediaan pasta gigi dengan daging lidah buaya konsentrasi 50%

### 3.11.2 Prosedur Pembuatan Pasta Gigi Daging Lidah Buaya

Sediaan pasta gigi daging lidah buaya dibuat dengan cara daging lidah buaya, Kalsium karbonat, Na CMC, Natrium lauryl sulfat, Natrium benzoat, gliserin, OMP dan Aquadest ditimbang sesuai formulasi. Kemudian Na-CMC dilarutkan dalam air panas. Didiamkan selama 15 menit, setelah itu diaduk hingga homogen sebagai massa 1. Di dalam lumpang gerus kalsium karbonat dan ditambahkan Natrium lauryl sulfat, digerus homogen sebagai massa 2. Ditambahkan massa 1 ke dalam massa 2 digerus hingga homogen. Kemudian dilarutkan daging lidah buaya dengan gliserin diaduk homogen dan ditambahkan ke dalam lumpang, kemudian digerus hingga homogen. Dilarutkan Natrium benzoat ke dalam aquadest diaduk hingga larut dan ditambahkan ke dalam lumpang, digerus hingga homogen sampai terbentuk massa pasta. Kemudian ditambahkan *Oleum Menthae Piperitae* (OMP) ke dalam massa pasta, digerus homogen. Setelah terbentuk pasta yang homogen, kemudian masukkan dalam wadah tube (Rarung, dkk., 2022).

## 3.12 Uji Sifat Fisik Pasta Gigi Daging Lidah Buaya

### 3.12.1. Uji Organoleptis

Pengamatan organoleptik pasta gigi meliputi bentuk, warna dan aroma yang diamati. Secara objektif, Pengamatan ini bertujuan untuk melihat terjadinya perubahan secara signifikan pada sediaan yang telah dibuat (Rarung, dkk., 2022).

### 3.12.2 Uji pH

Pengukuran pH dilakukan dengan cara alat pH meter dikalibrasi terlebih dahulu dengan mencelupkan elektrodanya ke dalam aquadest agar pH netral, setelah itu elektroda dicelupkan kedalam sampai angkanya konstan. Replikasi sebanyak 3 kali pada masing-masing formula lalu diambil rata-rata. pH sediaan dikatakan baik jika memenuhi standar mutu pasta gigi yaitu sebesar 4,5-10,5. Menurut SNI 12-3524-1995 (Firmansyah, 2021).

### 3.12.3 Uji Homogenitas

Pada pasta gigi ditimbang sebanyak 1 gram lalu diletakkan pada kaca objek untuk diamati homogenitasnya. Apabila tidak terdapat butiran-butiran kasar maka pasta gigi yang diuji dinyatakan homogen. Replikasi sebanyak tiga kali pada masing-masing formula (Firmansyah, 2021).

### 3.12.4 Uji Viskositas

Pengukuran viskositas menggunakan alat viskometer. Pasta gigi ditimbang sebanyak 200 gram dimasukkan ke dalam beaker glass 250 ml. Spindel nomor 4 dipasangkan lalu diturunkan hingga batas spindel tercelup ke dalam sediaan pasta gigi kemudian diaduk dengan kecepatan 20 rpm. Tunggu beberapa saat sampai nilai muncul pada alat viskometer B-One Plus. Replikasi sebanyak tiga kali pada masing-masing formula (Febrianti, dkk., 2021).

### 3.12.5 Uji Daya Sebar

Sampel seberat 1 gram diletakkan di antara 2 kaca. Lalu diberi beban sebesar 50 gram di atas kaca dan ditunggu selama 1 menit, kemudian diukur diameternya. Setelah itu, ditambahkan beban 100 gram ditunggu selama 1 menit dan diukur diameternya. Pengukuran diameter dilakukan pada tiga titik yang berbeda dan diambil rata-ratanya (Rarung, dk., 2022).

### 3.12.6 Uji Daya Lekat

Sediaan pasta gigi sebanyak 0,25 gram ditimbang dan diletakkan pada kaca objek kemudian ditutup dengan kaca objek yang lain sampai tertutup sempurna. Beban seberat 200 gram diletakkan di atas kaca objek yang menutupi sediaan selama 5 menit. Kemudian beban sebesar 100 gram digunakan untuk melepaskan kaca objek dari lekatan pasta gigi. Waktu yang digunakan untuk melepas kedua kaca objek kemudiab diukur menggunakan stopwatch. Replikasi sebanyak tiga kali pada masing-masing formula (Rarung, dkk., 2022).

### 3.12.7 Uji Pembentukan Busa

Pengujian pembentukan busa pasta gigi dilakukan dengan mengambil 2 gram pasta gigi dan dimasukkan ke dalam gelas ukur 25 ml. Kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 15 ml. Gelas ukur ditutup dengan alumunium foil dan dikocok gelas ukur selama 1 menit dan diukur . Dikocok sebanyak 5 kali dan diamati tinggi busa yang terbentuk. Replikasi sebanyak tiga kali pada masing-masing formula (Firmansyah, 2021).

### 3.12.8 Uji Aktivitas Antibakteri Pasta Gigi Daging Lidah Buaya

1. **Sterilisasi Alat**

Sterilisasi dilakukan dengan cara yang sesuai terhadap masing-masing alat. Alat-alat yang disterilkan harus dalam keadaan bersih dan kering. Tabung reaksi, cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer dibungkus dengan kertas perkamen dan diikat dengan benang wol, kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu 180℃ selama 1 jam. Pinset dan jarum ose disterilkan dengan cara dipijarkan pada nyala bunsen (Rarung, dkk., 2022).

1. **Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)**

Ditimbang sebanyak 5,6 gram Nutrient Agar, kemudian dilarutkan dalam 200 ml aquadest menggunakan erlenmeyer. Dihomogenkan di atas hotplate samapi media Nutrient Agar benar-benar larut. Larutan tersebut kemudian distrerilkan di autoklaf dengan suhu 121℃ selama 30 menit. Disimpan pada lemari pendingin, dan dipanaskan kembali di hotplate ketika digunakan (Rarung, dkk., 2022).

1. **Peremajaan Bakteri *Streptococcus mutans***

Di dalam cawan petri dituang media Nutrient Agar (NA) sebanyak 15 ml, dibiarkan pada suhu ruang sampai memadat. Bakteri uji *Streptococcus mutans* yang berasal dari biakan murni diambil dengan jarum ose yang sudah dipijarkan di nyala bunsen, kemudian diinokulasi dengan cara digoreskan pada media Nutrient Agar (NA). Kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37℃. Diamati pertumbuhan bakterinya (Rarung, dkk., 2022).

1. **Pembuatan Suspensi *Streptococcus mutans***

Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diremajakan diambil dengan jarum ose yang telah dipijarkan di nyala bunsen. Kemudian disuspensikan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 0,9% sampai didapat kekeruhan suspensi bakteri yang sama dengan kekeruhan standar *Mc.Farland* dengan konsentrasi 108 CFU/ml (Rarung, dkk., 2022).

**3.13 Uji Aktivitas Antibakteri Daging Lidah Buaya**

Uji antibakteri daging lidah buaya dilakukan dengan metode *difusi* cakram (*Difusi Disk Stokes*) . Sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri diambil dengan mikropipet, kemudian dituangkan diatas cawan petri. Kemudian ditambahkan 15 ml media Nutrient Agar (NA), dicampurkan dengan cara membuat angka delapan sampai 15 kali. Dibiarkan pada suhu ruang sampai media memadat. Media yang telah memadat Letakkan blank disc yang sudah direndam dengan daging lidah buaya berbagai konsentrasi (30%, 40%, 50%, 80%, 90% dan 100%), selama 1 X 24 jam pada media biakan.  Kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam dengan suhu incubator 37°C. Ukur zona hambat (zona bening) di sekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong (mm) yang diatur jaraknya (Simorangkir, 2020).

**3.14. Uji Antibakteri Pasta Gigi Daging Lidah Buaya**

Uji antibakteri sediaan pasta gigi daging lidah buaya dilakukan dengan metode sumuran. Sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri diambil dengan mikropipet, kemudian dituangkan diatas cawan petri. Kemudian ditambahkan 15 ml media Nutrient Agar (NA), dicampurkan dengan cara membuat angka delapan sampai 15 kali. Dibiarkan pada suhu ruang sampai media memadat. Media yang telah memadat dibuat lubang yang diatur jaraknya, kemudian pada masing-masing lubany dimasukkan 0,1 ml sediaan pasta gigi dengan berbagai konsentrasi (10%, 30%, dan 50%), sediaan yang beredar di pasaran sebagai pembanding (pepsodent herbal daun sirih dan jeruk nipis) dan dasar sediaan sebagai blanko. Kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37℃. Setelah 24 jam diukur diameter zona hambat di sekitar lubang dengan menggunakan jangka sorong. Pengujian masing-masing dilakukan 3 kali pengulangan (Firmansyah, 2021).