# BAB IIIMETODE PENELITIAN

## 3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental, untuk memformulasikan sediaan pasta gigi herbal dari ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L*.*). Adapun rancangan penelitian ini dari persiapan penelitian, pencucian sampel hingga pengekstrakan sampel, formulasi sediaan pasta gigi herbal ekstrak bunga telang dan uji evaluasi sediaan.

### 3.1.1 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat dua jenis variabel penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), simplisia bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), esktrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dan formulasi sediaan pasta gigi ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L.). Variabel terikat pada penelitian ini adalah karakteristik simplisia, golongan metabolit sekunder, evaluasi sediaan mutu fisik, dan aktivitas antibakteri.

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter penelitian pada penelitian ini adalah mikroskopik serbuk simplisia, makroskopik simplisia, kadar air, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut dalam etanol, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, glikosida, triterpenoid/steroid, organoleptis, pH, homogenitas, daya sebar, dala lekat, viskositas, tinggi busa, dan zona daya hambat.

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari – Mei.

### 3.2.2 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al – Washliyah Medan.

## 3.3 Bahan

Bahan yang digunakan adalah bunga telang segar yang akan dibuat menjadi ekstrak, 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 Piperitae*), Natrium benzoat, aquadest, larutan pereaksi Bouchardat, larutan pereaksi Dragendrof, 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, isopropanol, dan toluene.

## 3.4 Peralatan

Alat yang digunakan adalah *autoclave*, *inkubator*, oven, *rotary evaporator*, blander, *waterbath*, *moisture analizer*, neraca analitik, bunsen, toples maserasi, batang pengaduk, cawan petri, cawan porselin, jarum ose, penggaris, mortir, stamper, pipet tetes, beaker glass, indikator pH universal, sendok tanduk, wadah pasta gigi, corong glass, kertas saring, tabung reaksi, erlenmeyer dan alumunium foil.

## 3.5 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

### 3.5.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *purposive*, yaitu pengambilan tanpa membandingkan dengan daerah lain. Bagian tumbuhan yang digunakan yaitu bunga telang (*Clitorian ternate* L*.*) yang di ambil dari daerah sekitaran Medan.

### 3.5.2 Identifikasi Tumbuhan

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

### 3.5.3 Penyiapan Sampel

Bunga telang dicuci menggunakan air bersih yang mengalir, pencucian dilakukan sebanyak 3 kali. Setelah dicuci, selanjutnya dilakukan pengeringan simplisia terhadap bunga telang (Depkes RI, 1995). Setelah bunga telang kering dilanjutkan dengan proses penggilingan simplisia kering hingga menjadi serbuk simplisia dan disimpan dalam wadah bersih, kering dan tertutup rapat (Depkes RI, 2013).

### 3.5.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea.*)

Sebanyak 500 gram simplisia dimaserasi dengan 3750 ml etanol 96%, dimasukkan kedalam bejana tertutup dan dibiarkan pada suhu kamar selama 5 hari dan terlindung dari cahaya matahari sambil sesekali diaduk, kemudian diserkai, diperas dan disaring. Maserat dipisahkan dengan ampas. Ampas dibilas 1250 ml etanol 96% dan didiamkan selama 2 hari. Kemudian diserkai, diperas, dan disaring. Filtrat dipekatkan dengan alat *rotary evaporator*, kemudian diuapkan di *waterbath* hingga di dapat ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

## 3.6 Pembuatan Larutan Perekasi

### 3.6.1 Larutan Pereaksi HCL (e)

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

### 3.6.2 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N

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

### 3.6.3 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).

### 3.6.4 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).

### 3.6.5 Larutan Pereaksi Dragendroff

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).

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

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

### 3.6.7 Larutan Pereaksi Lieberman-Buchard

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

## 3.8 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).

### 3.8.1 Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik merupakan pengujian yang dilakukan dengan mata telanjang atau dengan bantuan kaca pembesar terhadap berbagai organ tanaman yang digunakan seperti bentuk, warna, bau, dan ukuran simplisia (Depkes RI, 1995).

### 3.8.2 Pemeriksaan Mikroskopik

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

### 3.8.3 Penetapan Kadar Air

Dimasukkan 200 ml toluena dan 2 ml air suling ke dalam labu destilasi ,hubungkan alat 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. Kedalam labu tersebut dimasukkan sebanyak 5 gram serbuk simplisia, 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 serbuk simplisia tersebut (Ditijen POM, 2000).

Rumus perhitungan penetapan kadar air:

 % kadar air simplisia = $\frac{volume air akhir-volume air awal}{berat sampel} x 100\%$

### 3.8.4 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Air

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia 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 simplisia (Depkes RI, 2000).

Rumus perhitungan penetapan kadar sari larut dalam air:

 Kadar sari larut air = $\frac{\left(berat cawan berisi-berat cawan kosong\right)x pengenceran}{berat sampel} x 100\%$

### 3.8.5 Penetapan Kadar Sari Larut Dalam Etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia 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 simplisia (Depkes RI, 2000).

Rumus perhitungan penetapan kadar sari larut dalam etanol:

Kadar sari larut dalam etanol =

$$\frac{\left(berat cawan berisi-berat cawan kosong\right)x pengenceran}{berat sampel} x 100\%$$

### 3.8.6 Penetapan Kadar Abu Total

Ditimbang serbuk simplisia 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 = $\frac{(berat krus porselin berisi-berat krus porselin kosong)}{berat sampel} x 100\%$

### 3.8.7 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 di dinginkan dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang di keringkan 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 = $\frac{(berat krus porselin berisi-berat krus porselin kosong)}{berat sampel} x 100\%$

## 3.9 Skrining Fitokimia Simplisia dan Ekstrak Etanol Bunga Telang

### 3.9.1 Pemeriksaan Alkaloida

Ditimbang 0,5 gram serbuk simplisia dan ekstrak, 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 Bouchardat, pada tabung ketiga ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff. Alkaloida disebut positif jika terbentuk endapan pada paling sedikit dua dari tiga percobaan diatas (Depkes RI, 1978).

### 3.9.2 Pemeriksaan Tanin

Ditimbang 0,5 gram serbuk simplisia dan ekstrak, kemudian ditambahkan 10 ml aquadest lalu disaring. Filtrat diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna. Diambil 2 ml hasil pengenceran, ditambahkan dengan 1-2 tetes besi (III) klorida. Terjadi warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Marjoni, 2016).

### 3.9.3 Pemeriksaan Saponin

Ditimbang 0,5 gram serbuk simplisia dan ekstrak, 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).

### 3.9.4 Pemeriksaan Flavonoida

Ditimbang sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia dan ekstrak, 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).

### 3.9.5 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Ditimbang sebanyak 1 gram serbuk simplisia dan ekstrak, dimaserasi dengan n-heksan selama 2 jam, lalu disaring. 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).

#### 3.9.6 Pemeriksaan Glikosida

Ditimbang sebanyak 3 gram serbuk simplisia dan ekstrak, 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 isopropanol. Pada kumpulan sari ditambahkan natrium sulfat anhidrat, disaring, diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50℃, 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 bewarna ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya komponen gula (glikon) (Depkes RI, 1989).

## 3.10 Prosedur Penelitian

### 3.10.1 Formulasi Pasta Gigi Herbal Ekstrak Etanol Bunga Telang

 Formulasi sediaan pasta gigi dapat dilihat pada Tabel 3.1

**Tabel 3.1** Formulasi sediaan pasta gigi ekstrak bunga telang

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Bahan** | **Formulasi** | **Kegunaan** |
| Kontrol Negatif | FI(%) | FII(%) | FIII(%) |
| Ekstrak Bunga Telang | - | 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 Lauril Sulfat | 2 | 2 | 2 | 2 | Detergen |
| *Oleum Menthae Piperitae* (OMP) | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | Perasa |
| Natrium Benzoat | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | Bahan Pengawet |
| Aquadest | 100 | 100 | 100 | 100 | Pelarut |

**Keterangan:**

Kontrol Negatif : Formulasi sediaan pasta gigi dengan ekstrak bunga telang 0

FI : Formulasi sediaan pasta gigi dengan ekstrak bunga telang 10%

F2 : Formulasi sediaan pasta gigi dengan ekstrak bunga telang 30%

F3 : Formulasi sediaan pasta gigi dengan ekstrak bunga telang 50%

### 3.10.2 Pembuatan Pasta Gigi Herbal Ekstrak Etanol Bunga Telang

Sediaan pasta gigi herbal ekstrak bunga telang dibuat dengan cara ekstrak bunga telang, kalsium karbonat, Na-CMC, natrium lauril 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 lauril sulfat, digerus homogen sebagai massa 2. Ditambahkan massa 1 ke dalam massa 2 digerus hingga homogen. Kemudian dilarutkan ekstrak etanol bunga telang 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 dimasukkan ke dalam wadah tube (Afni, 2015).

## 3.11 Uji Sifat Fisik Pasta Gigi Herbal Ekstrak Etanol Bunga Telang

### 3.11.1 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 (Afni, 2015).

### 3.11.2 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 sediaan sampai angkanya konstan. Replikasi sebanyak tiga kali pada masing-masing formula. Menurut SNI 12-3524-1995, syarat pH dari pasta gigi yaitu 4,5 – 10,5 (Febrianti *et al*., 2021).

### 3.11.3 Uji Homogenitas

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 (Syurgana *et al*., 2017).

### 3.11.4 Uji Viskositas

Pengukuran viskositas menggunakan alat viskometer. Pasta gigi ditimbang sebanyak 200 gram dimasukkan kedalam 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 (Syurgana *et al*., 2017).

### 3.11.5 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 (Doko, 2018).

### 3.11.6 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 g 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 kemudia diukur menggunakan stopwatch. Replikasi sebanyak tiga kali pada masing-masing formula (Marchaban *et al*., 2017).

### 3.11.7 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 dan dikocok sebanyak 5 kali dan diamati tinggi busa yang terbentuk. Replikasi sebanyak tiga kali pada masing-masing formula (Ria, 2017).

## 3.12 Uji Aktivitas Antibakteri Pasta Gigi Herbal Ekstrak Etanol Bunga Telang

### 3.12.1 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 (Afni, 2015).

### 3.12.2 Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Ditimbang sebanyak 5,6 gram Nutrient Agar, kemudian dilarutkan dalam 200 ml aquadest menggunakan erlenmeyer. Dihomogenkan di atas hotplate sampai 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 (Afni, 2015).

### 3.12.3 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 (Afni, 2015).

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 (Afni, 2015).

### 3.12.4 Uji Antibakteri Pasta Gigi Ekstrak Etanol Bunga Telang

Uji antibakteri sediaan pasta gigi ekstrak etanol bunga telang 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 lubang 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 (Dirjen POM, 1995).