

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pertama dalam penelitian ini adalah rimpang temu kunci (*Boesenbergia Rotunda*) yang didapatkan dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Populasi kedua dalam penelitian ini adalah *gummy candy* ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia Rotunda*) dengan variasi gelatin dan maltodekstrin.

2. Sampel

Sampel pertama untuk penelitian ini adalah rimpang temu kunci (*Boesenbergia Rotunda*) yang sudah siap panen dan dicabut secara acak dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel kedua untuk penelitian ini adalah *gummy candy* ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia Rotunda*) dengan variasi gelatin dan maltodekstrin yang diambil secara acak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama, ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia Rotunda*) yang diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Variabel utama kedua, formulasi *gummy candy* ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia Rotunda*) dengan variasi gelatin dan maltodekstrin.

Variabel utama ketiga, mutu, stabilitas fisik dan aktivitas antibakteri *gummy candy* ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia Rotunda*) terhadap *S. mutans*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan menjadi beberapa macam variabel antara lain variabel bebas, variabel kendali, serta variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah tujuannya untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi gelatin dan

maltodekstrin pada formulasi sediaan *gummy candy* ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia rotunda*)

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung. Variabel kendali pada penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji, kondisi laboratorium seperti inkas, kesterilan alat dan bahan, media yang digunakan, dan metode ekstraksi.

Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi terhadap variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah mutu dan stabilitas fisik sediaan serta aktivitas antibakteri *gummy candy* ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia rotunda*).

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, rimpang temu kunci adalah rimpang yang berasal dari tanaman temu yang mempunyai bau khas dan mengandung senyawa antibakteri. Rimpang diambil dari tanaman temu kunci yang sudah siap panen dicabut secara acak dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk rimpang temu kunci adalah rimpang temu kunci yang telah dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 24 jam, setelah kering diayak menggunakan ayakan No. 60.

Ketiga, ekstrak rimpang temu kunci adalah ekstrak yang diperoleh dari serbuk rimpang temu kunci yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.

Keempat, evaluasi mutu fisik *gummy candy* adalah pengujian organoleptik dengan menggunakan panca indra (bau, rasa, tekstur), uji kadar air dengan metode pemanasan langsung menggunakan oven, uji kadar abu menggunakan metode analisis termogravimetri, uji kekenyalan mengukur tingkat kenyal *gummy candy*.

Kelima, evaluasi stabilitas fisik *gummy candy* adalah pengujian stabilitas *gummy candy* dilakukan dengan meletakkan setiap formula *gummy candy* dalam wadah dan disimpan selama 2 minggu pada suhu sejuk (8°C – 15°C), suhu kamar (15°C – 30°C), dan suhu hangat (30°C – 40°C). Selanjutnya sediaan *gummy candy* diamati secara organoleptis meliputi aroma, warna, rasa, kekenyalan, serta dilakukan uji keseragaman bobot.

Keenam, bakteri uji dalam penelitian ini diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta yaitu bakteri *S. mutans* ATCC 25175.

Ketujuh, uji aktivitas antibakteri adalah uji dengan metode ALT dengan konsentrasi 30%, variasi gelatin dan maltodekstrin, kontrol positif, kontrol negatif.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan meliputi rimpang temu kunci, etanol 70%, gelatin, maltodekstrin, gliserin, gom arab, gula stealah, metil paraben, asam citrat, aquadest, chlorhexidine, bakteri *Streptococcus mutans*, standar Mc Farland 0,5, H₂SO₄ pekat, CH₃COOH aquadest, pereaksi Mayer, pereaksi Bouchardat, pereaksi Dragendorff, kalium dikromat, magnesium, HCl, amil alkohol, asam klorida 2N, FeCl₃, etanol 96%, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media agar darah, media *Nutrient Agar* (NA), NaCl 0,9%, cairan kristal violet, larutan yodium, larutan safranin, H₂SO₂ 3%, DMSO 10%, tetracycline.

2. Alat

Alat yang digunakan meliputi *Laminar Air Flow* (LAF), blender, timbangan digital, alat-alat gelas, pipet tetes, batang pengaduk, *rotary vacum evaporator*, krus porselin, kertas saring, kain flanel, corong, cawan petri, inkubator, *Moisture balance*, desikator, mikroskop, jarum ose, kapas lidi steril, oven, *autoclave*, jangka sorong, objek glass, deck glass, ayakan nomor 60, waterbath, nampan, pipet mikro, botol maserator, tabung reaksi, rak tabung, lemari pendingin, kertas cakram, *magnetic stirrer*, pisau, bunsen, korek api, penggaris, pinset, alumunium foil dan cetakan.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman menentukan keakuratan sampel tanaman temu kunci (*Boesenbergia rotunda*) dalam hal makroskopis dan membandingkan morfologi tanaman yang diuji dengan literatur di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Pengambilan Sampel

Tanaman temu kunci (*Boesenbergia rotunda*) yang didapatkan dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *simple random sampling*.

3. Pembuatan Serbuk Rimpang Temu Kunci

Langkah dalam pembuatan serbuk yaitu dibuat dari potongan simplisia atau simplisia utuh yang telah dikeringkan lalu melewati proses pembuatan serbuk menggunakan alat yang tidak menimbulkan kerusakan atau kehilangan kandungan kimia simplisia dan diayak sehingga didapatkan serbuk. Tingkat kehalusan serbuk simplisia menggunakan ayakan No. 60 (Kumalasari *et al.*, 2020). Tujuan dari pembuatan serbuk yaitu agar luas partikel bahan yang digunakan saat kontak dengan larutan penyari dapat diperluas hingga penyarian berlangsung efektif (Kemenkes RI, 2017).

Pembuatan serbuk dilakukan dengan cara mencuci bersih rimpang temu kunci menggunakan air mengalir. Rimpang temu kunci yang sudah dicuci lalu ditiriskan dan dipotong kecil kemudian ditimbang serta dikeringkan dibawah sinar matahari langsung dengan ditutup kain hitam sampai kering. Rimpang temu kunci yang sudah kering dilakukan penyerbukan menggunakan alat penyerbuk kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 40 hingga diperoleh serbuk rimpang temu kunci dengan derajat kehalusan yang homogen.

3.1. Pengujian Susut Pengeringan Serbuk Simplisia. Susut pengeringan dilakukan dengan cara serbuk rimpang temu kunci ditimbang sebanyak 2 g lalu dimasukkan dalam alat *Moisture balance* dengan wadah alas alumunium foil yang telah diberi tanda. Amati hasil dengan suhu 105°C hingga alat menunjukkan pada angka tetap (Suhardiman *et al.*, 2020). Syarat uji susut pengeringan yaitu tidak lebih dari 10% (FHI, 2017)

$$\% \text{ Susut pengeringan} = \frac{\text{bobot awal}-\text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

4. Pembuatan ekstrak

Ekstrak rimpang temu kunci dibuat menggunakan metode maserasi. Simplisia yang digunakan sebanyak 1000 gram dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan (1:10) sebanyak 10 liter. Rendam selama 6 jam pertama, kemudian diamkan selama 18 jam sesekali diaduk. Maserat dipisahkan dengan penyaringan. Lakukan proses ekstraksi lebih dari 1 kali dengan jumlah pelarut 5 L (setengah kali jumlah volume pelarut pertama). Maserat kemudian diuapkan menggunakan vakum atau penguap tekanan rendah hingga mendapatkan ekstrak kental (FHI, 2017). Rumus perhitungan rendemen ekstrak rimpang temu kunci:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

4.1. Pengujian Penetapan Kadar Air. Pengujian kadar air dalam ekstrak dilakukan dengan metode gravimetri. Ekstrak ditimbang lebih kurang 10 gram kemudian dimasukkan ke dalam cawan penguap yang telah ditara. Selanjutnya dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Lanjutkan pengeringan pada selang waktu 1 jam dan ditimbang sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (FHI, 2017)

4.2. Pengujian bebas etanol ekstrak. Pengujian bebas etanol dilakukan sebelum uji aktivitas antibakteri, tujuan dari pengujian bebas etanol yaitu untuk mengetahui ekstrak rimpang temu kunci yang dibuat sudah murni atau tidak ada kandungan etanol didalamnya. Terdapat 2 cara dalam pengujian bebas etanol, pertama yaitu ekstrak dimasukkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan dengan reagen H₂SO₄ pekat dan CH₃COOH kemudian dipanaskan. Hasil bebas etanol ditandai dengan tidak ada aroma ester khas etanol (Kurniawati, 2015). Cara kedua yaitu ekstrak dimasukkan pada tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes H₂SO₄ pekat dan 1 mL kalium dikromat. Hasil bebas etanol yakni dengan tidak adanya perubahan warna jingga hingga hijau kebiruan (Klau *et al.*, 2021).

5. Skrining Fitokimia

5.1. Flavonoid. Sampel ekstrak kental rimpang temu kunci diambil secukupnya lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan air panas 10 ml, selanjutnya saring, ambil 5 mL ditambah 100 mg magnesium, 1 mL HCl dan 2 mL amil alkohol. Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuknya lapisan amil alkohol warna kuning, jingga atau merah (Depkes RI, 1995)

5.2. Alkaloid. Sampel ekstrak kental rimpang temu kunci 0,5 gram ditambah dengan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL aquadest kemudian dipanaskan 2 menit lalu didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi 3 tabung reaksi kemudian diberi pereaksi Mayer, Bouchardat, Dragendorff. Pereaksi mayer positif ditandai dengan adanya endapan putih dan kuning. Pereaksi bouchardat positif ditandai dengan adanya endapan coklat hingga hitam. Pereaksi dragendorff positif ditandai dengan adanya endapan jingga hingga coklat ataupun merah bata. Sampel dinyatakan mengandung alkaloid apabila 2 dari 3 pereaksi mendapatkan hasil positif (Depkes RI, 1995).

5.3. Tanin. Sampel ekstrak kental rimpang temu kunci diambil secukupnya dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 10 mL air panas dan disaring, filtrat ditambah FeCl₃. Positif tanin ditandai dengan adanya warna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Depkes RI, 1995).

5.4. Saponin. Sampel ekstrak kental rimpang temu kunci diambil secukupnya dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan aquadest panas kemudian dikocok hingga muncul buih dan didiamkan selama 2 menit. Positif saponin ditandai dengan terbentuknya busa (Depkes RI, 1995).

5.5. Minyak atsiri. Sampel ekstrak rimpang temu kunci diambil secukupnya lalu dimasukkan kedalam cawan porselin dan ditambahkan etanol 96% kemudian diuapkan diatas busen. Positif minyak atsiri ditandai dengan adanya bau khas dari temu kunci.

6. Pembuatan Media

6.1. Media Nutrient Agar (NA). Serbuk NA ditimbang sebanyak 2,3 gram kemudian dilarutkan dengan 100 mL aquadest dan dilakukan pemanasan sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Media disterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm (Hudaya *et al.*, 2014).

6.2. Media Mueller Hinton Agar (MHA). Serbuk MHA ditimbang sebanyak 9,5 gram kemudian dilarutkan dengan 250 mL aquadest dan dipanaskan sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Media disterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm (Raenza *et al.*, 2019).

6.3. Media Agar Darah. Serbuk Blood Agar Base (Oxoid) sebanyak 8 gram kemudian dilarutkan dengan 200 mL aquadest serta dilakukan pemanasan sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Media disterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit (Krihariyani *et al.*, 2016)

7. Peremajaan Bakteri *Streptococcus Mutans*

Biakan murni bakteri *streptococcus mutans* diambil sebanyak 2 ose menggunakan jarum ose steril, selanjutnya ditanamkan pada media NA dengan menggoreskan miring secara perlahan. Hasil kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menggunakan inkubator (Hassanudin dan Salnus, 2020).

8. Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus Mutans*

Langkah pembuatan suspensi bakteri uji yaitu dengan cara hasil dari peremajaan bakteri pada media NA dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah diberi 10 mL larutan NaCl 0,9%, kemudian dihomogenkan lalu diinkubasi selama 5-8 jam, apabila hasil yang diperoleh lebih keruh dari standar Mc Farland 0,5 maka perlu ditambah NaCl 0,9% hingga warnanya sama dengan standar yaitu setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Namun apabila hasil inkubasi lebih jernih daripada standar Mc Farland 0,5 maka perlu diinkubasi lagi dengan penambahan waktu 1-3 jam, tujuannya untuk mengetahui apakah kekeruhan tersebut bertambah atau ditambahkan beberapa ose koloni pada media selektif lalu diinkubasi selama 1-3 jam. Bakteri pada larutan NaCl 0,9% yang tepat dengan kekeruhannya merupakan larutan stok bakteri *streptococcus mutans* (Rahmawati, 2019).

9. Identifikasi Bakteri

9.1. Pewarnaan Gram. Pewarnaan gram dilakukan dengan mensterilkan ose pada api bunsen hingga merah menyala dan didiamkan beberapa saat didekat api agar ose tetap aseptis. Ambil bakteri menggunakan ose yang telah disterilkan lalu diratakan pada objek glass, kemudian ditambahkan aquadest 1 tetes dan dikeringkan dengan melewatkannya diatas api bunsen hingga mengering. Pewarnaan diawali dengan Gram A yaitu cairan kristal violet, lalu didiamkan 1-2 menit, kemudian dibilas perlahan menggunakan air mengalir. Setelah dibilas selanjutnya ditetesi Gram B yaitu larutan yodium lalu didiamkan selama 1-2 menit kemudian dibilas perlahan menggunakan air mengalir. Kemudian ditetesi Gram C yaitu larutan alkohol 70%, didiamkan 30 detik selanjutnya ditambahkan larutan Gram D yaitu larutan safranin dan dikeringkan pada sekitar bakteri yang diwarnai. Dilakukan pengamatan dengan mikroskop, sebelum diamati objek glass ditetesi dengan larutan imersi untuk memperjelas bakteri serta menghindari indeks bias. Pengamatan menggunakan perbesaran 100x (Jawets *et al.*, 2007). *Streptococcus mutans* adalah bakteri Gram positif sehingga hasil pewarnaan Gram yang terlihat yaitu warna ungu (Dewi, 2013).

9.2. Media Agar Darah. Proses identifikasi dilakukan dengan menggoreskan suspensi bakteri pada permukaan media agar darah menggunakan kapas lidi steril. Bakteri kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif jika terbentuk hemolisis alfa (α) yang berada

disekitar koloni bakteri menghasilkan warna kehijauan (Jawetz *et al.*, 2007).

9.3. Uji Biokimia. Pengujian biokimia dibagi menjadi dua macam pengujian yaitu koagulase dan katalase. Pertama pengujian katalase dengan cara suspensi bakteri ditambahkan H_2O_2 3%. Hasil positif apabila terbentuknya gelembung udara (Abdullah, 2010). Kedua pengujian koagulase, plasma sitrat dimasukkan kedalam tabung reaksi steril secara aseptis, 2-3 ose suspensi bakteri uji dimasukkan kedalam tabung dan dicampurkan. Tabung reaksi selanjutnya inkubasi dengan suhu 37°C, diamati pada 18-24 jam. Hasil positif bila terbentuknya gumpalan plasma didasar tabung reaksi (Dewi, 2013).

10. Uji aktivitas antibakteri ekstrak

Membuat konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci dengan konsentrasi 15%, 20% dan 30% menggunakan pelarut DMSO 10%. DMSO 10% dapat melarutkan sebagian besar senyawa yang bersifat polar serta non polar, DMSO 10% tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri pada ekstrak sehingga pemilihan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Tablet amoksisinil sebagai kontrol positif yang akan diujikan menggunakan media MHA. Media MHA ± 50 ml dimasukkan cawan petri secara aseptis di dalam inkas ditunggu hingga memadat. Suspensi bakteri diambil sesuai standar Mc Farland 0,5 sebanyak ± 1 mL menggunakan pipet volume, kemudian masukkan cawan petri yang sudah diisi media MHA. Cawan petri digoyang-goyangkan memutar agar suspensi dari bakteri dapat bercampur merata dalam media MHA, tunggu sampai memadat. Langkah selanjutnya, cawan petri dibalik dan diberi tanda 5 daerah uji untuk 3 variasi konsentrasi ekstrak, 1 kontrol positif, dan 1 kontrol negatif. Cakram kosong direndam dengan sampel uji, kontrol positif, dan kontrol negatif menggunakan mikropipet 50 μ L. Cakram yang sudah diisi diletakkan pada cawan petri berisi campuran media dan suspensi bakteri sesuai dengan daerah yang sudah dibuat untuk masing-masing sampel uji (Rahmawati, 2019). Inkubasi selama 18-20 jam pada suhu 35°C±2 °C (CLSI, 2016). Ukur dan amati diameter zona hambat yang terbentuk ditandai dengan adanya zona bening. Lakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Pratiwi, 2008).

11. Pembuatan Formula

Formulasi yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Zico (2011) yang telah dimodifikasi dengan rancangan formula sesuai tabel 1.

Tabel 1. Rancangan formula gummy candy ekstrak rimpang temu kunci

Bahan	Formula (mg)						
	F1	F2	F3	K- 1	K- 2	K- 3	K+
Ekstrak rimpang temu kunci	30%*	30%*	30%*	-	-	-	-
Gelatin	575	600	625	575	600	625	600
Maltodekstrin	135	110	85	135	110	85	110
Gliserin	400	400	400	400	400	400	400
Gom arab	20	20	20	20	20	20	20
Gula SteaLaf™	630	630	630	630	630	630	630
Metil paraben	3	3	3	3	3	3	3
Asam sitrat	37	37	37	37	37	37	37
Aquades	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Keterangan :

F1 : Formula satu *gummy candy* dengan variasi gelatin 80,9% : maltodekstrin 19,1%

F2 : Formula dua *gummy candy* dengan variasi gelatin 84,5% : maltodekstrin 15,5%

F3 : Formula tiga *gummy candy* dengan variasi gelatin 88% : sirup glukosa 12%

Kontrol + : Sediaan *gummy candy* chlorhexidin

Kontrol - : Formula *gummy candy* tanpa ekstrak

*: Konsentrasi menyesuaikan hasil orientasi

12. Pembuatan Sediaan *Gummy Candy*

Rimpang temu kunci diformulasikan pada *gummy candy* dengan konsentrasi yang telah disepakati sesuai hasil orientasi. Proses pembuatan *gummy candy* ekstrak rimpang temu kunci diawali dengan menyiapkan semua bahan kemudian menimbang sesuai dengan formula yang tertera pada tabel. Selanjutnya proses pengembangan gelatin dalam setengah air panas diatas *waterbath* dan ditambahkan ekstrak rimpang temu kunci, kemudian dikembangkan gom arab dalam gliserin. Proses selanjutnya dengan mencampurkan gom arab dan gliserin kedalam campuran ekstrak dan gelatin pada suhu 50°C sesekali diturunkan, lalu ditambahkan maltodekstrin dan gula SteLeaf™, diaduk ad homogen. Kemudian beker gelas ditutup menggunakan kertas almunium foil dan ditunggu hingga tebentuk basis *gummy candy*, proses berikutnya melarutkan asam sitrat dengan sisa aquadest lalu masukkan kedalam campuran basis *gummy candy*. Beaker diturunkan kemudian ditambahkan metil paraben. Campuran kemudian dituangkan kedalam cetakan lalu didinginkan hingga terbentuk massa *gummy candy*.

13. Evaluasi sediaan *gummy candy*

13.1 Uji Organoleptik. Pengujian organoleptik dilakukan menggunakan panca indera yang dilakukan meliputi pemeriksaan warna, rasa, bau, dan tekstur (Andini *et al.*, 2017).

13.2 Uji kadar air. Uji kadar air dilakukan dengan memanaskan cawan beserta tutupnya ke dalam oven dengan suhu 105°C selama lebih kurang 30 jam kemudian didinginkan dalam desikator selama 20-30

menit lalu ditimbang dengan neraca analitik (cawan dan tutup). *Gummy candy* dimasukkan kedalam cawan porselen dan ditimbang, kemudian dimasukkan kedalam oven selama 3 jam dengan suhu 100-105°C, lalu didinginkan pada desikator dan dilakukan penimbangan. Standar kadar air sediaan *gummy candy* dalam SNI 3547.2-2008 yaitu maksimal 20% (Badan Standarisasi Nasional, 2008). Rumus perhitungan kadar air yaitu:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{berat sampel}-\text{berat kering}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

13.3 Uji kadar abu. Pengujian kadar abu dilakukan dengan menimbang cawan porselen yang sudah dikeringkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu 105C kemudian didinginkan dalam desikator. Sampel dimasukkan dalam cawan porselen lalu ditimbang. Panaskan pada api bunsen dan diletakkan kedalam tanur pada suhu 500°C selama 6 jam hingga didapatkan abu warna putih. Cawan porselen didinginkan dalam desikator, lalu ditimbang berat abu (Yulia *et al.*, 2022). Syarat kadar abu yang diperbolehkan dalam sediaan *gummy candy* dalam SNI 3547.2-2008 yaitu tidak boleh lebih dari 3%. Rumus perhitungan kadar abu yaitu:

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{berat abu}}{\text{berat awal}} \times 100\%$$

13.4 Uji kekenyalan. *Gummy candy* dilakukan pengujian satu persatu dengan 3 kali replikasi dengan cara meregangkan *gummy candy* dan diukur seberapa jauh *gummy candy* tersebut meregang, seperti ketika *gummy candy* yang ada dipasaran dengan parameter semakin pendek regangan dan tidak mudah putus maka *gummy candy* semakin kenyal (Prasetyo, 2011).

13.5 Uji stabilitas. Pengujian dilakukan dengan meletakkan setiap formula *gummy candy* dalam wadah dan disimpan selama 2 minggu pada suhu sejuk (8°C – 15°C), suhu kamar (15°C – 30°C), dan suhu hangat (30°C – 40°C). Selanjutnya sediaan *gummy candy* diamati secara organoleptis meliputi aroma, warna, rasa, kekenyalan, serta dilakukan uji keseragaman bobot (Rashati *et al.*, 2019).

14. Uji Aktivitas antibakteri *gummy candy* (Angka Lempeng Total)

14.1 Pengujian tahap tanpa perlakuan. Bakteri uji diambil 1 mL lalu dimasukkan dalam tabung yang berisi 9 mL aquadest untuk pengenceran pertama sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Pengenceran 10^{-1} diambil lagi 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi berisi 9 mL aquadest sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} kemudian dilakukan

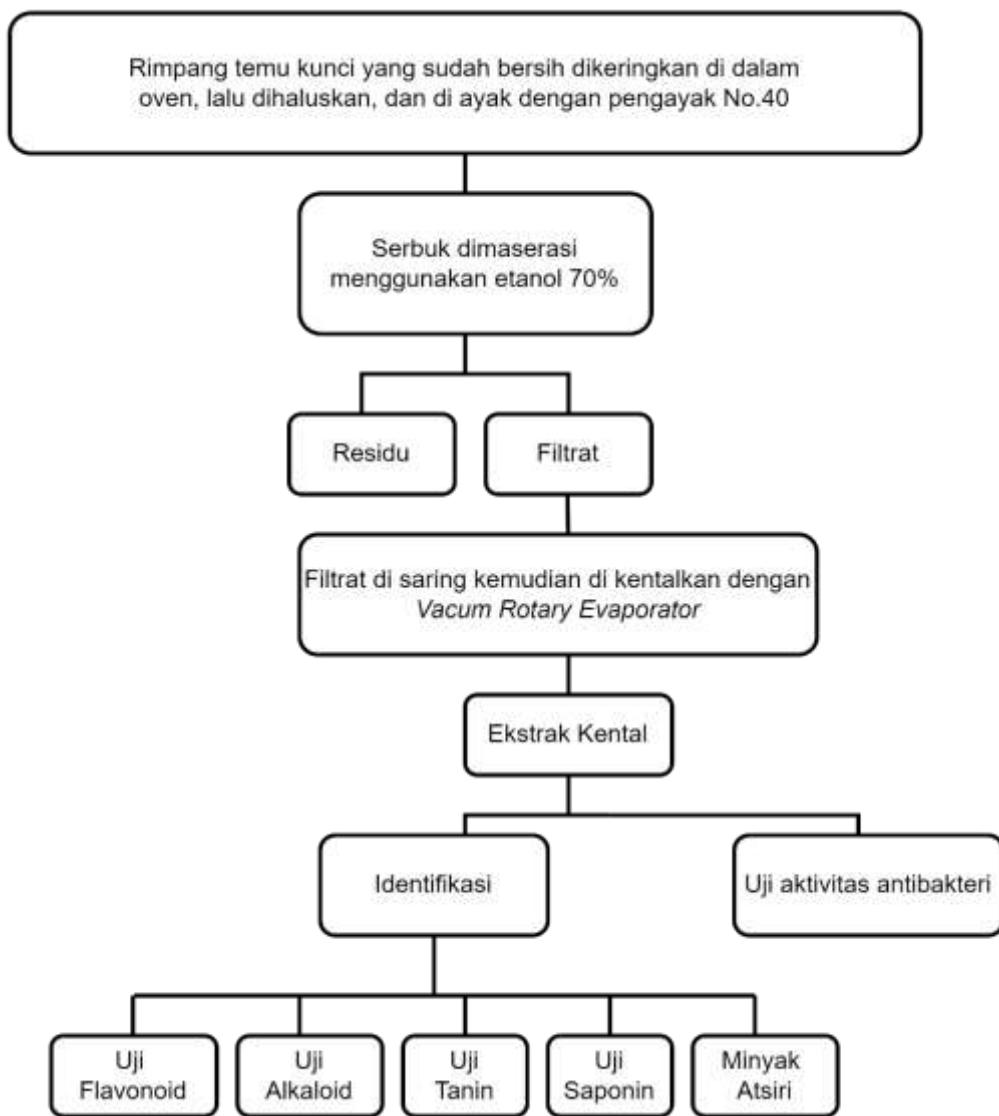
pengenceran sampai tingkat pengenceran yang diharapkan. Setiap cawan petri ditambahkan media NA disetiap pengenceran. Selanjutnya mengambil 1 mL bakteri yang telah diencerkan lalu masukkan cawan petri yang telah ditambahkan media NA, goyang-goyang cawan petri sampai merata dan tunggu memadat. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 24-48°C, amati jumlah bakteri yang tumbuh. Syarat jumlah koloni bakteri yaitu berkisar antara 25-250 koloni.

14.2 Pengujian tahap dengan perlakuan. Sediaan *gummy candy* ekstrak rimpang temu kunci dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian dimasukkan bakteri uji sebanyak 1 mL lalu ditambahkan ditambahkan NaCl Saliva ad 600 mL, tunggu berapa lama *gummy candy* bisa melarut dengan sempurna. Sampel diambil 1 mL lalu dimasukkan dalam tabung yang berisi 9 mL aquadest untuk pengenceran pertama sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Pengenceran 10^{-1} diambil lagi 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi berisi 9 mL aquadest sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} kemudian dilakukan pengenceran sampai tingkat pengenceran yang diharapkan. Setiap cawan petri ditambahkan media NA disetiap pengenceran. Selanjutnya mengambil 1 mL sampel yang telah diencerkan lalu masukkan cawan petri yang telah ditambahkan media NA, goyang-goyang cawan petri sampai merata dan tunggu memadat. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 24-48°C, amati jumlah bakteri yang tumbuh.

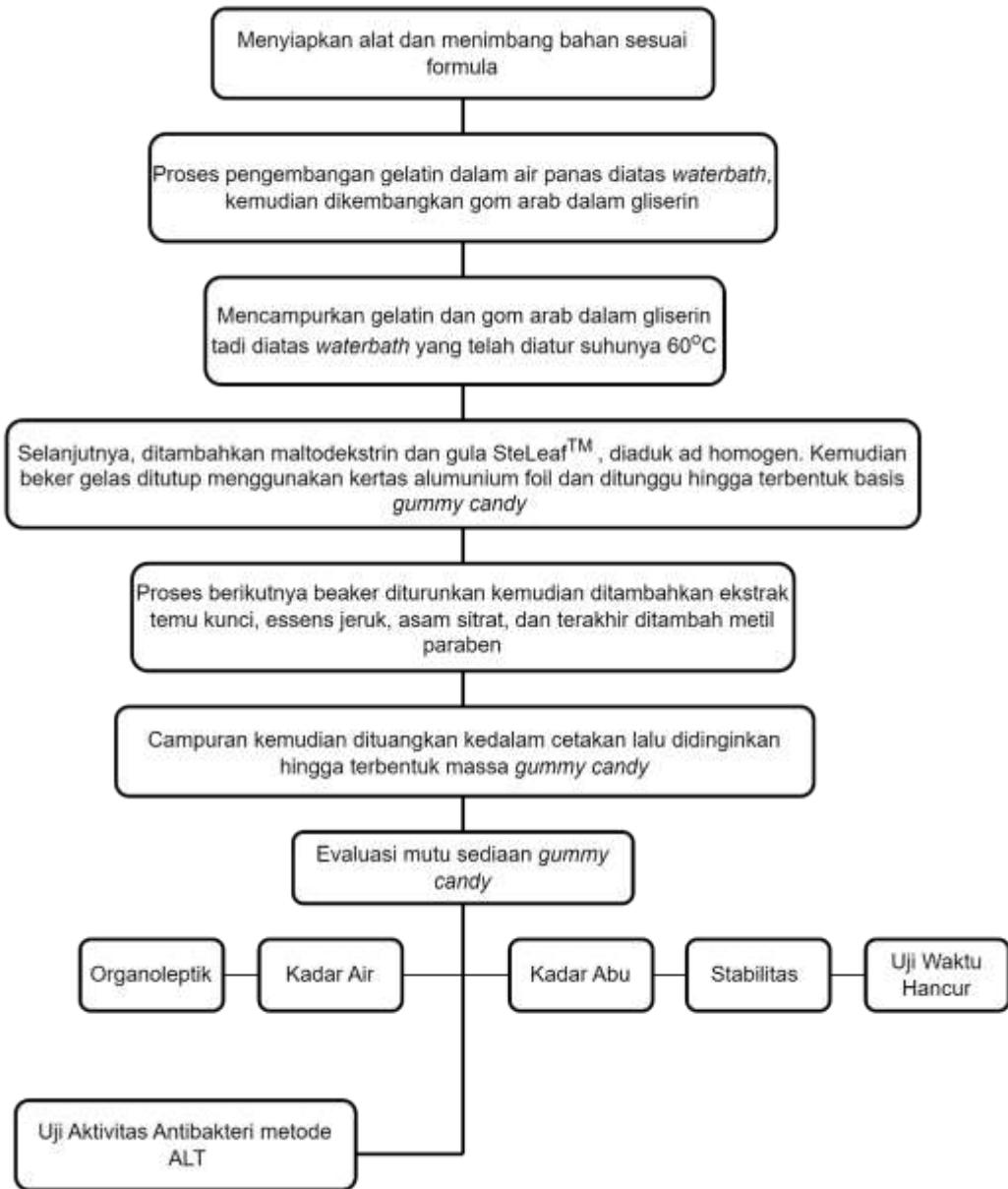
E. Analisis Hasil

Analisis hasil dilakukan menggunakan beberapa parameter yaitu uji mutu, stabilitas fisik serta uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram yang dianalisis dengan SPSS. Data uji mutu dan stabilitas fisik yang diperoleh dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro Wilks*, jika data yang diperoleh terdistribusi normal ($p>0,05$) maka diteruskan uji homogenitas *Lavene Test*, jika data yang diperoleh tidak terdistribusi normal ($p<0,05$) maka dilanjutkan uji *Kruskal-wallis*, apabila data dinyatakan normal serta homogen, maka dilanjutkan uji *One Way Anova*. Data aktivitas antibakteri yang dihasilkan dianalisis menggunakan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro Wilks*, jika data yang diperoleh terdistribusi normal ($p>0,05$) maka dilanjutkan uji homogenitas *Lavene Test*, jika data yang diperoleh tidak terdistribusi normal ($p<0,05$) dilakukan uji *Kruskal-wallis*, jika data dinyatakan normal dan homogen, maka dilakukan uji *One Way Anova*.

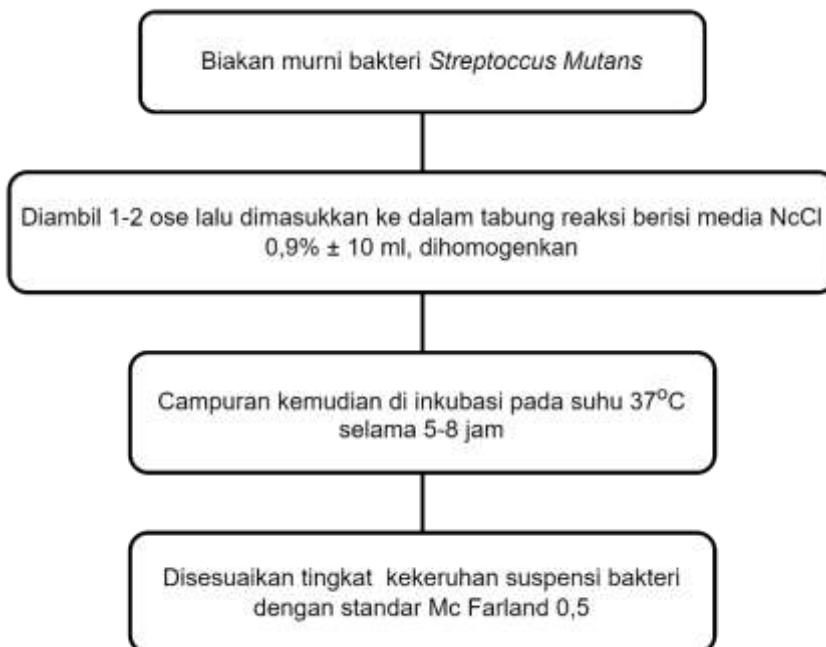
F. Skema Penelitian



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak dan identifikasi senyawa



Gambar 4. Skema pembuatan formula sediaan dan evaluasi sediaan



Gambar 5. Skema pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus Mutans*