

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah kelompok sasaran yang menjadi objek dalam suatu penelitian. Populasi pada penelitian ini adalah daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) yang berasal dari wilayah Ngancar, Kediri, Jawa Timur

2. Sampel

Sampel adalah sebagian dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah daun saga (*Abrus precatorius* Linn.), yang diambil secara acak dan dikumpulkan dengan memilih daun segar berwarna hijau, tidak terlalu tua maupun terlalu muda, serta telah siap dipetik di wilayah Ngancar, Kediri, Jawa Timur

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variable utama

Variabel utama dalam penelitian ini yang pertama adalah ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) dengan variasi konsentrasi gliserin sebesar 5%, 10%, dan 15%.

Variabel utama yang kedua adalah mutu fisik, stabilitas, serta aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans* pada sediaan *mouthwash* berbahan ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* Linn.).

2. Klasifikasi variable utama

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sediaan *mouthwash* berbahan ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) dengan variasi konsentrasi gliserin sebesar 5%, 10%, dan 15%.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini meliputi daun saga (*Abrus precatorius* Linn.), formulasi sediaan *mouthwash*, bakteri uji *Streptococcus mutans*, kondisi laboratorium, media yang digunakan dalam penelitian, kondisi penelitian, suhu, serta metode penelitian.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji mutu fisik, stabilitas, dan aktivitas antibakteri sediaan *mouthwash* berbahan ekstrak daun saga, yang diukur melalui daya hambat terhadap bakteri *Streptococcus mutans* pada media uji.

3. Definisi operasional variable utama

Pertama, daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) adalah bagian daun dari tanaman saga yang dikenal sebagai tanaman herbal dan secara tradisional dimanfaatkan sebagai obat. Daun saga diperoleh dengan cara membeli dari daerah Ngancar, Kabupaten Kediri, Provinsi Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun saga dibuat melalui proses pemilihan daun, pencucian dengan air mengalir, pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 24 jam atau di bawah sinar matahari langsung, diikuti dengan penggilingan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk, dan pengayakan dengan mesh ukuran 60.

Ketiga, ekstrak daun saga adalah larutan atau konsentrat yang dihasilkan dari proses ekstraksi daun tanaman saga (*Abrus precatorius*). Proses ekstraksi ini melibatkan penggunaan pelarut (etanol) untuk menarik senyawa aktif yang terdapat dalam daun saga, seperti flavonoid, saponin, tanin, dan alkaloid. Ekstrak daun saga dihasilkan melalui proses maserasi dengan pelarut etanol 70% menggunakan perbandingan 1:10, kemudian diuapkan hingga menjadi pekat.

Keempat, bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri Gram positif berbentuk kokus yang berperan utama dalam pembentukan plak gigi serta terjadinya karies gigi. Bakteri *Streptococcus mutans* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta dan diuji menggunakan metode difusi cakram.

Kelima, sediaan *mouthwash* ekstrak daun saga adalah *mouthwash* yang mengandung ekstrak daun saga dalam konsentrasi 7% sedangkan variasi konsentrasi gliserin 5%, 10%, dan 15%, dengan kontrol negatif berupa sediaan tanpa ekstrak dan kontrol positif berupa *mouthwash* komersial "P".

Keenam, uji mutu fisik, uji stabilitas, dan uji aktivitas antibakteri sediaan *mouthwash* ekstrak daun saga terhadap *Streptococcus mutans* dilakukan menggunakan metode difusi cakram, dengan pengamatan zona bening pertumbuhan bakteri pada media uji.

Ketujuh, *mouthwash* "P" adalah cairan antiseptik yang berfungsi untuk memelihara kebersihan mulut serta kesehatan gigi dan gusi yang mengandung bahan aktif ekstrak daun sirih dan komponen lainnya yang memiliki sifat antiseptik, antiinflamasi, serta membantu mengurangi pertumbuhan bakteri, menghambat pembentukan plak, serta mencegah terjadinya gigi berlubang. *Mouthwash* "P" digunakan sebagai kontrol positif atau pembanding dalam pengujian daya hambat bakteri menggunakan metode difusi kertas cakram.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daun saga, etanol 70%, Gliserin, Natrium Benzoat, Tween 80, Sodium Sakarin, *Peppermint oil*, *aquadest*, bakteri *Streptococcus mutans*, standar Mc Farland 0,5. media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dan media NA (*Nutrient Agar*), Pepsodent mouthwash herbal, FeCl_3 0,1%, HCL pekat, HCL, pereaksi *Liebermann Burchard*, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, H_2O_2 3% (hydrogen peroksida), serbuk Mg, HCL 2N, H_2SO_4 pekat, CH_3COOH , darah (serum), plasma sitrat, NaCl, pewarna cairan cristal violet, (Gram A), cairan yodium (Gram B), cairan alcohol 70% (Gram C), cairan safranin (Gram D), spiritus dan minyak imersi.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kertas saring, *rotary vacum evaporator*, bejana, corong, mortir, stamper, gelas ukur, tabung reaksi, timbangan digital, pengaduk kaca, spatel, *waterbath*, *autoclave*, oven, pipet, blender, jarum ose, *laminar air flow* (LAF), inkubator, pinset, viskometer Oswald, piknometer, mikroskop, *objek glass*, pH meter, cawan petri, lampu bunsen, *autovortex*, *deck glass*, ayakan nomor 60, botol plastik untuk sediaan *mouthwash*, rak tabung reaksi, kapas lidi steril, lemari pendingin, kertas cakram, kain flanel, krus porselin, cawan porselen, spidol permanen, korek api, vial dan penggaris.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Penelitian ini diawali dengan verifikasi sampel tanaman daun saga (*Abrus precatorius* Linn.), yang dilakukan berdasarkan karakteristik mikroskopis, makroskopis, serta morfologi tanaman. Proses ini mencakup penentuan determinasi tanaman, yang disertai dengan bukti laboratorium, dan dilaksanakan di RSUP Dr. Sardjito, Jawa Tengah.

2. Pengambilan dan pembuatan serbuk daun saga

Daun saga yang digunakan dalam penelitian ini dipilih dari daun muda yang segar dan bebas dari serangan serangga. Penggunaan daun muda dalam penelitian ini dilakukan karena daun muda cenderung memiliki kandungan senyawa aktif yang lebih tinggi dan lebih efektif dibandingkan dengan daun yang lebih tua. Selain itu, daun muda

biasanya lebih segar dan bebas dari kerusakan atau kontaminasi, sehingga kualitas dan potensi ekstraknya lebih optimal. Daun-daun tersebut diambil dari tanaman saga yang berasal dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Setelah dikumpulkan, daun dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Selanjutnya, dilakukan penimbangan untuk mengetahui bobot awal sebelum proses pengeringan. Proses pengeringan dilakukan di bawah sinar matahari langsung dengan menggunakan penutup kain hitam untuk mencegah kotoran atau debu menempel pada daun. Setelah daun kering, langkah berikutnya adalah menggilingnya menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Serbuk daun saga kemudian diayak menggunakan mesh ukuran 60 untuk mendapatkan ukuran partikel yang seragam.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun saga

Penentuan kadar susut pengeringan serbuk daun saga menggunakan metode gravimetri. Proses kerja dilakukan dengan menimbang cawan timbang konstan, menimbang serbuk daun saga sekitar 1-2 gram di dalamnya, lalu mengeringkannya dalam oven pada suhu 105°C hingga mencapai bobot konstan. Susut pengeringan dihitung dari perbedaan bobot awal serbuk terhadap bobot konstan akhir untuk menentukan kadar air yang menguap. Persentase susut pengeringan dinyatakan dalam bentuk persen (FI V).

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

4. Pembuatan ekstrak daun saga

Ekstraksi serbuk kering dilakukan dengan metode maserasi, yaitu merendamnya dalam pelarut yang sesuai, yaitu etanol 70%. Pelarut ini dipilih karena mampu mengekstrak sebagian besar metabolit sekunder dalam serbuk simplisia. Serbuk kering ditimbang satu bagian, kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca gelap atau bejana, dan ditambahkan 10 bagian pelarut etanol 70%. Perendaman dilakukan selama 6 jam dengan sesekali digojok, lalu dibiarkan selama 18 jam. Untuk memisahkan maserat, digunakan sentrifugasi. Proses maserasi diulangi sekali lagi dengan menggunakan pelarut yang sama, namun dengan jumlah pelarut setengah dari volume pelarut pada maserasi pertama. Maserasi yang dihasilkan kemudian diuapkan menggunakan alat *rotavapor* hingga diperoleh ekstrak kental.

Hasil rendemen dihitung dengan membandingkan bobot ekstrak yang diperoleh dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dalam penelitian, dinyatakan dalam persentase bobot (b/b). Hasil rendemen akhir harus sesuai dengan standar yang ditetapkan dalam monografi

ekstrak masing-masing. Pembuatan ekstrak juga dapat dilakukan dengan metode lain seperti sokletasi, perkolasi, atau menggunakan *counter current* (Depkes RJ, 2017).

Rendemen ekstrak daun saga dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{berat simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

5. Pengujian kadar air ekstrak daun saga

Menimbang 10 gram ekstrak ke dalam wadah krus porselen yang telah ditara. Ekstrak kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam, lalu ditimbang. Proses pengeringan dilanjutkan dengan penimbangan setiap satu jam hingga diperoleh bobot yang konstan, yang dianggap konstan jika perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak melebihi 10,0% (Depkes RI, 2017).

Kadar air =

$$\frac{\text{Bobot sebelum dikeringkan} - \text{Bobot setelah dikeringkan}}{\text{Bobot sebelum dikeringkan}} \times 100\%$$

6. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak daun saga

Identifikasi kandungan senyawa dilakukan untuk menentukan senyawa-senyawa yang terdapat dalam serbuk maupun ekstrak daun saga.

6.1 Identifikasi kualitatif flavonoid. Melarutkan 1 gram ekstrak kental daun saga dalam 1 hingga 2 ml etanol 96% P, kemudian diaduk hingga larut sepenuhnya. Filtrat hasil larutan disaring menggunakan kertas saring, lalu diukur sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan penguap. Ke dalam filtrat tersebut ditambahkan 0,05 gram serbuk seng p.a dan 10 tetes HCl pekat P, kemudian didiamkan selama beberapa menit. Munculnya warna jingga hingga merah intensif menunjukkan adanya kandungan flavonoid.

6.2 Identifikasi kualitatif saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak kental daun saga dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air panas. Larutan tersebut dididihkan dan dikocok dengan kuat selama 10 detik. Indikasi adanya saponin ditunjukkan oleh terbentuknya buih yang stabil dengan tinggi 1 hingga 10 cm, yang bertahan selama tidak kurang dari 10 menit.

6.3 Identifikasi kualitatif alkohol. Sebanyak 0,5 gram ekstrak kental daun saga dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes H₂ SO₄ pekat P dan 1 ml larutan K₂ CrO₇. Hasil positif ditunjukkan dengan munculnya warna hijau kebiruan pada larutan ekstrak.

7. Pengujian bebas etanol ekstrak

Pengujian bebas etanol dilakukan sebelum uji aktivitas antibakteri untuk memastikan ekstrak yang digunakan murni dan tidak terkontaminasi etanol, yang dapat menyebabkan hasil positif palsu karena sifat antibakteri dan antijamur dari etanol. Prosedur pengujian dilakukan dengan memasukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian menambahkan reagen H_2SO_4 pekat dan CH_3COOH (asam asetat), lalu memanaskannya. Ekstrak dinyatakan bebas etanol jika tidak tercium aroma ester khas dari etanol selama pengujian (Kurniawati, 2008).

8. Konsentrasi ekstrak daun saga

Ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* L.) dengan konsentrasi 7% menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans*. Berdasarkan hasil penelitian yang tercantum dalam jurnal, zona hambat yang dihasilkan pada konsentrasi 7% yaitu sebesar 10,14 mm terhadap *Staphylococcus aureus* dan 11,08 mm terhadap *Streptococcus mutans*. Nilai ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 7%, ekstrak daun saga telah mampu memberikan efek penghambatan yang cukup terhadap kedua jenis bakteri tersebut, meskipun belum sekuat konsentrasi 10% yang menghasilkan daya hambat tertinggi. Aktivitas antibakteri ini dipengaruhi oleh kandungan senyawa bioaktif dalam daun saga seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, dan fenol, yang bekerja dengan berbagai mekanisme dalam merusak dinding sel bakteri dan menghambat pertumbuhannya. (Veronika *et al.*, 2023).

9. Rancangan formulasi sediaan *mouthwash* ekstrak daun saga

Tabel 2. Rancangan formula sediaan kumur ekstrak daun saga:

Bahan	Formula				Kegunaan
	F0 (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	
Ekstrak daun saga	-	7	7	7	Zat aktif
Gliserin	5	5	10	15	Humektan
Natrium benzoate	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengawet
Tween 80	1	1	1	1	Penstabil / emulgator
Sodium sakarin	0,1	0,1	0,1	0,1	Flavoring agent
<i>Oleum menthae</i>	0,3	0,3	0,3	0,3	Flavoring agent
<i>Aqua destilata ad</i>	100	100	100	100	Pelarut

Keterangan :

F0 : Kontrol negatif (sediaan *mouthwash* tanpa ekstrak) dengan konsentrasi gliserin 5%

K+ : Kontrol positif pepsodent *mouthwash* herbal

F1 : Formula 1 *mouthwash* ekstrak daun saga dengan konsentrasi gliserin 5%

F2 : Formula 2 *mouthwash* ekstrak daun saga dengan konsentrasi gliserin 10%

F3 : Formula 3 *mouthwash* ekstrak daun saga dengan konsentrasi gliserin 15%

10. Pembuatan sediaan *mouthwash*

Pertama, botol ditara, kemudian semua bahan yang akan digunakan untuk pembuatan sediaan *mouthwash* ditimbang. Natrium benzoat dan natrium sakarin dilarutkan dalam sedikit *aqua destilata* dan diaduk hingga larut (campuran 1). Ekstrak daun saga dan *oleum menthae* dicampur dengan tween 80, lalu diaduk hingga homogen, kemudian ditambahkan gliserin sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga merata (campuran 2). Campuran 1 ditambahkan secara perlahan ke dalam campuran 2 sambil terus diaduk hingga homogen, lalu dimasukkan ke dalam botol. Tambahkan *aqua destilata* hingga volume mencapai 100 gram, kocok hingga merata, dan tutup botol rapat. Prosedur ini diulangi untuk formula yang lain.

11. Pengujian mutu fisik sediaan *mouthwash*

11.1. Uji Organoleptis. Uji organoleptik dilakukan secara visual untuk menilai bentuk, warna, dan kejernihan *mouthwash* ekstrak daun saga.

11.2. Uji pH. Uji pH dilakukan menggunakan pH meter. Alat dikalibrasi terlebih dahulu dengan larutan dapar pH 7 dan pH 4. Elektroda pH meter kemudian dimasukkan ke dalam sediaan, dan jarum pada monitor dibiarkan bergerak hingga menunjukkan hasil pH yang stabil. Nilai pH yang tertera pada monitor dicatat. Standar mutu untuk *mouthwash* adalah pH 5-7 (Handayani *et al.*, 2017). Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali.

11.3. Uji bobot jenis. Uji bobot jenis dilakukan menggunakan piknometer. Prosedur dimulai dengan mencuci piknometer menggunakan aquadest, lalu membilasnya dengan alkohol. Setelah itu, piknometer dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C dan didinginkan dalam eksikator. Setelah kering, piknometer kosong ditimbang untuk menentukan bobot awal. Selanjutnya, piknometer diisi dengan cairan dan ditimbang kembali untuk menentukan bobot akhir (Rahmi *et al.*, 2021).

Rumus:

$$rx = \frac{b - a}{c - a}$$

Keterangan :

rx = bobot jenis sampel

a = berat pikno kosong

b = berat pikno + sampel uji

c = berat pikno + sampel air

11.4. Uji Viskositas. Uji viskositas sediaan *mouthwash* dilakukan menggunakan metode kapiler atau viskometer Ostwald. Prosedur dimulai dengan mengisi tabung kapiler dengan sampel pada suhu 20°C. Waktu alir air dan waktu alir sediaan *mouthwash* ditentukan dengan cara mengisi tabung kapiler hingga meniskus cairan mencapai garis teratas menggunakan alat pengisap, kemudian membuka tabung kapiler untuk memungkinkan cairan mengalir ke wadah. Waktu alir cairan dari batas atas ke batas bawah dalam tabung kapiler dicatat (Departemen Kesehatan RI, 1995). Massa jenis air dan massa jenis sediaan *mouthwash* ditentukan menggunakan piknometer. Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali.

Viskositas dihitung dengan rumus :

$$\text{Viskositas} = \frac{\rho_2 t_2}{\rho_1 t_1} \times \eta_{\text{air}}$$

Keterangan :

η_1 = viskositas air (cp)

η_2 = viskositas zat cair yang dicari (cp)

ρ_1 = massa jenis air (g/ml)

ρ_2 = massa jenis zat cair yang dicari (g/ml)

t_1 = waktu alir air (detik(s))

t_2 = waktu alir zat yang dicari (detik(s))

11.5. Uji stabilitas. Pengujian stabilitas dilakukan menggunakan metode stabilitas dipercepat pada kondisi penyimpanan suhu ruang. Sediaan *mouthwash* disimpan selama 14 hari. Sampel sediaan *mouthwash* diletakkan pada suhu (1°C) dan pada suhu (50°C) selama 24 jam (1 siklus) (Agustin, 2018). Pengujian dilakukan selama 14 hari (7 siklus) dan diamati perubahan fisik dari sediaan pada awal dan akhir siklus.

12. Sterilisasi alat

Sterilisasi merupakan proses untuk membunuh mikroorganisme. Sterilisasi dapat dilakukan dengan memanaskan jarum ose di atas api Bunsen hingga ujung jarum ose menjadi merah membara. Metode sterilisasi bakteri pada tabung reaksi dilakukan dengan melewati mulut tabung reaksi yang berisi bakteri di atas api Bunsen. Untuk sterilisasi *objek glass*, prosesnya dilakukan dengan memanaskan langsung di atas api Bunsen. Sebelum digunakan untuk menempatkan cakram kertas pada cawan petri yang telah ditanami bakteri uji, pinset harus disterilkan terlebih dahulu. Metode sterilisasi dengan oven digunakan untuk sterilisasi alat berbahan kaca seperti cawan petri dan tabung Erlenmeyer yang telah dibungkus kertas. Proses ini dilakukan

pada suhu 160-180°C selama 120 menit hingga 3 jam. Sementara itu, metode sterilisasi menggunakan autoklaf diperuntukkan bagi alat-alat yang tahan panas, dengan suhu 121°C selama 15 menit (Tille, 2017).

13. Pembuatan media uji

13.1 Pembuatan media Nutrient Agar (NA). Sebanyak 23 gram serbuk NA dilarutkan dengan *aquadest* sebanyak 1 liter, kemudian dipanaskan sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut sepenuhnya. Media NA disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm (Hudaya *et al.*, 2014).

13.2 Pembuatan media Media Muller Hinton Agar (MHA). Sebanyak 38 gram serbuk MHA dilarutkan dalam 1 liter *aquadest*, kemudian dipanaskan sambil terus diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga tercampur secara homogen. Media MHA disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm (Hudaya *et al.*, 2014).

13.3 Pembuatan media agar darah. Sebanyak 40 gram *Blood Agar Base* (Oxoid) dilarutkan dalam 1 liter *aquadest*. Media tersebut kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Krihariyani *et al.*, 2016).

14. Inokulasi bakteri uji

Bakteri *Streptococcus mutans* diambil menggunakan jarum ose steril, kemudian ditanamkan pada media NA miring dengan metode goresan. Goresan tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Hassanudin dan Salnus, 2020).

15. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*

Proses pembuatan dilakukan dengan mengambil 1-2 ose biakan *Streptococcus mutans* yang telah diinokulasi pada media NA, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi larutan NaCl 0,9% sebanyak 10 ml. Larutan tersebut kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 5-8 jam. Jika hasil yang diperoleh lebih keruh dibandingkan standar McFarland 0,5, larutan akan diencerkan dengan menambahkan NaCl 0,9% hingga tingkat kekeruhan mencapai standar, yaitu setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Sebaliknya, jika hasil inkubasi lebih jernih dari standar McFarland 0,5, perlu dilakukan inkubasi tambahan selama 1-3 jam untuk melihat peningkatan kekeruhan. Alternatifnya, beberapa ose koloni dari media selektif dapat ditambahkan, kemudian larutan diinkubasi lagi selama 1-3 jam. Larutan NaCl 0,9% dengan kekeruhan yang sesuai dengan standar dianggap sebagai larutan stok bakteri *Streptococcus mutans* (Rahmawati, 2019).

16. Identifikasi bakteri uji *Streptococcus mutans*

16.1 Identifikasi Dengan Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram untuk identifikasi *Streptococcus mutans* merupakan metode pewarnaan diferensial yang bertujuan membedakan antara bakteri Gram positif dan Gram negatif sekaligus memberikan warna pada bakteri agar terlihat lebih jelas di bawah mikroskop. *Streptococcus mutans* termasuk bakteri Gram positif, yang ditandai dengan bentuk bulat (kokus) tersusun seperti rantai berwarna ungu. Warna ungu ini dipertahankan karena bakteri Gram positif memiliki dinding sel tebal yang kaya akan peptidoglikan, sehingga memungkinkan kompleks kristal-violet-yodium terperangkap dan bakteri tetap berwarna ungu (Jawetz *et al.*, 2007).

Tatacara pewarnaan dimulai dengan mempersiapkan bahan dan alat, seperti *Streptococcus mutans*, *objek glass*, jarum ose, dan bahan lainnya. Jarum ose disterilkan dengan api Bunsen hingga merah membara, lalu didinginkan di dekat api agar tetap aseptis, sementara *objek glass* dibersihkan dengan alkohol 70%. Selanjutnya, bakteri *Streptococcus mutans* diambil menggunakan jarum ose, diratakan di permukaan *objek glass*, ditambah setetes *aquadest*, kemudian dikeringkan dengan melewatkannya di atas api Bunsen hingga kering. Proses pewarnaan dimulai dengan meneteskan Gram A (Kristal violet) dan mendiamkannya selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya, Gram B (larutan yodium) ditetaskan, didiamkan selama 1 menit, dan dibilas lagi. Gram C (alkohol 70%) ditambahkan selama 30 detik, lalu kembali dibilas dengan air mengalir. Akhirnya, Gram D (safranin) ditambahkan sebagai pewarna tambahan, dan preparat dikeringkan. Sebelum pengamatan, larutan imersi ditetaskan untuk menghindari indeks bias agar bakteri terlihat lebih jelas. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100x untuk mempelajari bentuk dan sifat bakteri (Jawetz *et al.*, 2007).

16.2 Identifikasi dengan uji biokimia. Identifikasi *Streptococcus mutans* menggunakan uji biokimia dilakukan dengan menyiapkan dua tabung reaksi yang masing-masing berisi suspensi bakteri *Streptococcus mutans*. Pengujian yang dilakukan meliputi uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase dilakukan dengan menambahkan bakteri *Streptococcus mutans* ke *objek glass*, kemudian ditambahkan larutan H_2O_2 3%. Hasil positif pada uji katalase ditunjukkan dengan munculnya gelembung pada bakteri *Streptococcus mutans*. Selanjutnya, pada uji koagulase, tabung reaksi berisi suspensi *Streptococcus mutans*

ditambahkan plasma sitrat, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil negatif pada uji koagulase ditandai dengan tidak adanya plasma yang menggumpal, yang menunjukkan hasil positif untuk bakteri *Streptococcus mutans* (Jawetz *et al.*, 2007).

16.3 Identifikasi dengan agar darah. Proses identifikasi dilakukan dengan menggoreskan suspensi bakteri pada permukaan media agar darah di dalam cawan petri menggunakan jarum ose dengan metode penggoresan 4 kuadran. Setelah itu, bakteri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif untuk bakteri *Streptococcus mutans* ditunjukkan dengan adanya hemolisis alfa (α) yang terlihat pada area goresan di sekitar koloni bakteri dengan warna kehijauan (Jawetz *et al.*, 2007).

17. Metode uji difusi bakteri *Streptococcus mutans*

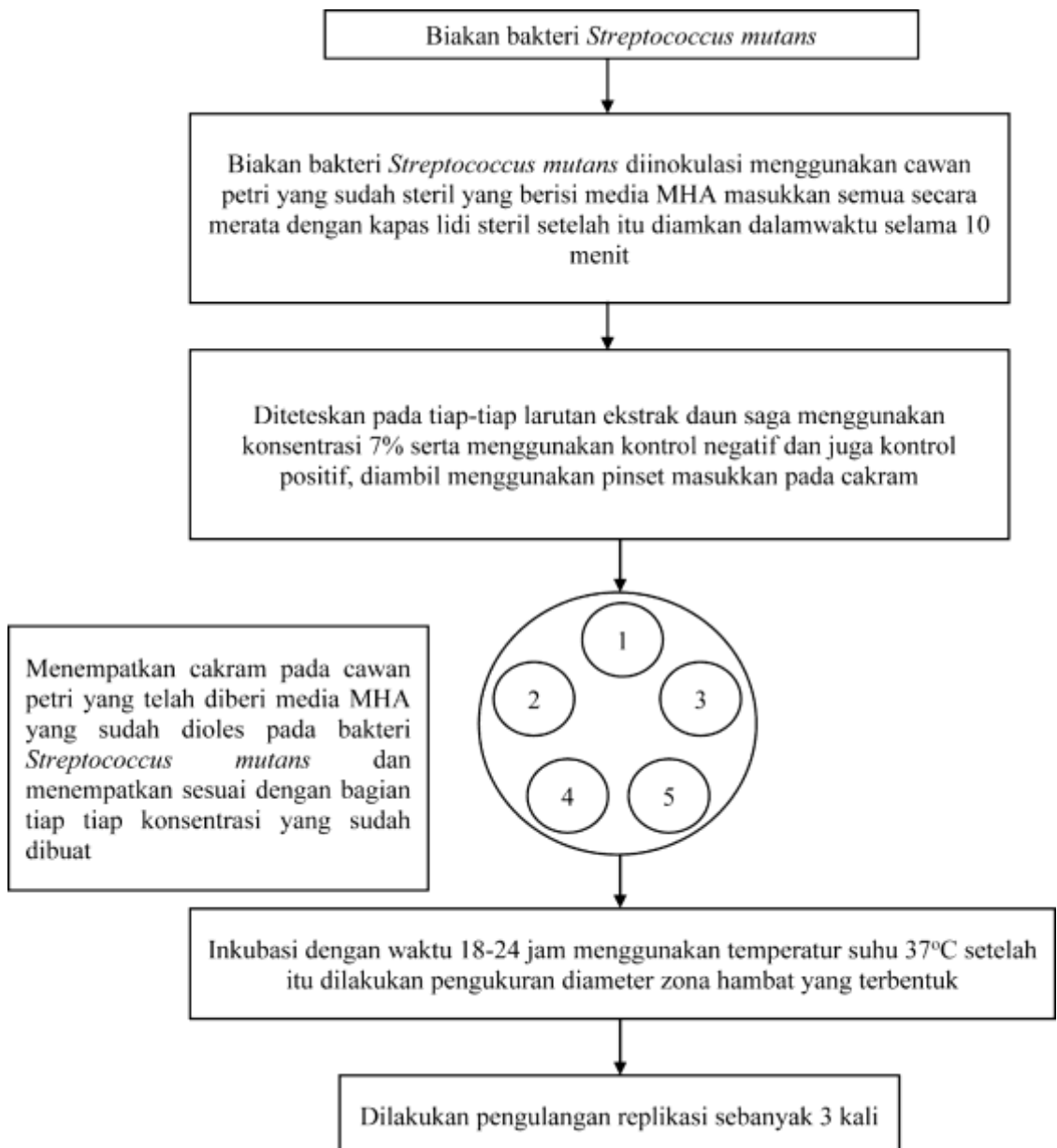
Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dilakukan menggunakan metode difusi cakram kertas. Prosedur dimulai dengan menyelupkan kapas lidi steril ke dalam suspensi bakteri *Streptococcus mutans* yang telah disiapkan, kemudian diinokulasikan pada media agar darah. Media kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit agar suspensi biakan dapat terdifusi secara merata ke dalam media. Selanjutnya, enam cakram kertas berukuran ± 6 mm ditempatkan pada media agar darah. Menggunakan mikropipet, 50 μ L formula *mouthwash* yang mengandung variasi konsentrasi gliserin ekstrak daun saga ditetaskan ke masing-masing cakram.

Empat cakram kertas digunakan untuk konsentrasi ekstrak daun saga dengan variasi konsentrasi 5%, 10%, dan 15%, sementara dua cakram lainnya digunakan sebagai kontrol. Kontrol negatif berupa *mouthwash* tanpa ekstrak daun saga, dan kontrol positif menggunakan *mouthwash* komersial "P". Setiap cakram mendapatkan 50 μ L larutan untuk pengujian. Media tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah inkubasi, daerah bening (zona hambat) di sekitar cakram kertas diamati dan diameternya diukur menggunakan penggaris dalam satuan milimeter. Pengujian daya hambat ekstrak daun saga terhadap *Streptococcus mutans* dilakukan sebanyak tiga kali untuk setiap konsentrasi yang diuji guna memastikan konsistensi hasil (Ditjen POM, 1995).

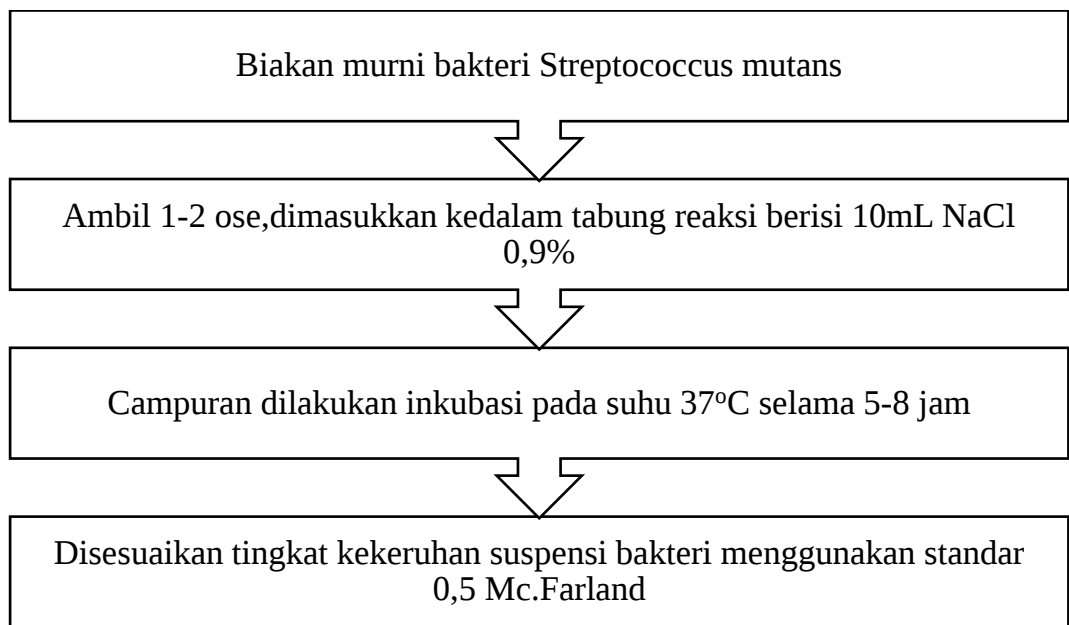
E. Analisis Hasil

Analisis data hasil pengukuran diameter daya hambat dilakukan secara komputerisasi menggunakan perangkat lunak program statistik. Uji statistik yang digunakan adalah *One Way ANOVA*, sesuai dengan penelitian yang melibatkan lebih dari dua perlakuan serta variabel penelitian yang bersifat bebas. Sebelum uji ANOVA dilakukan, data dianalisis terlebih dahulu untuk uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, karena jumlah sampel kurang dari 100. Jika data terdistribusi normal, uji dilanjutkan dengan *One Way ANOVA* ($p < 0,05$). Namun, jika data tidak terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* ($p > 0,05$). Setelah uji signifikansi dilakukan dan hasil menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji lanjutan *Post Hoc* menggunakan uji *Tukey*. Uji ini bertujuan untuk menentukan kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan.

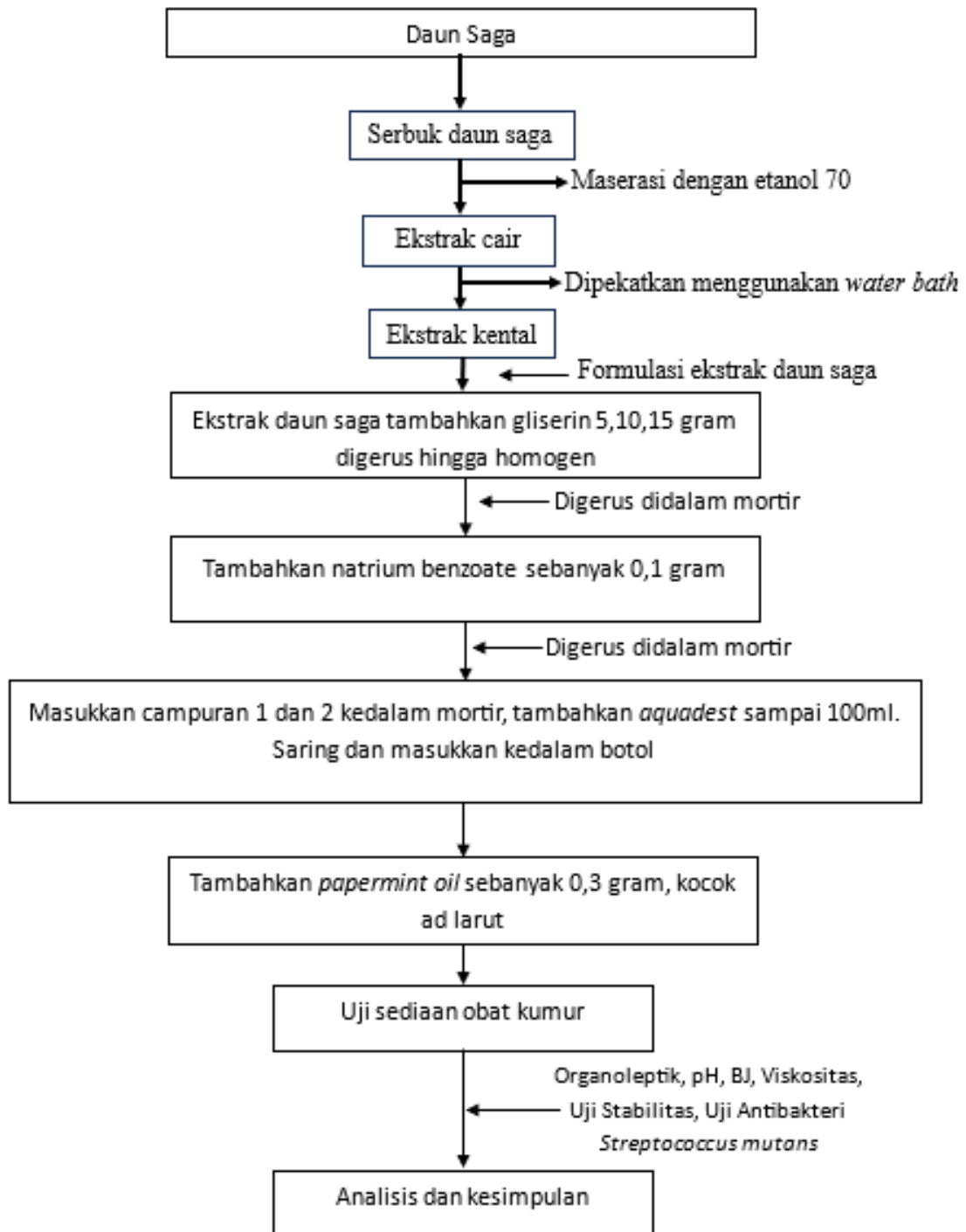
F. Skema Penelitian



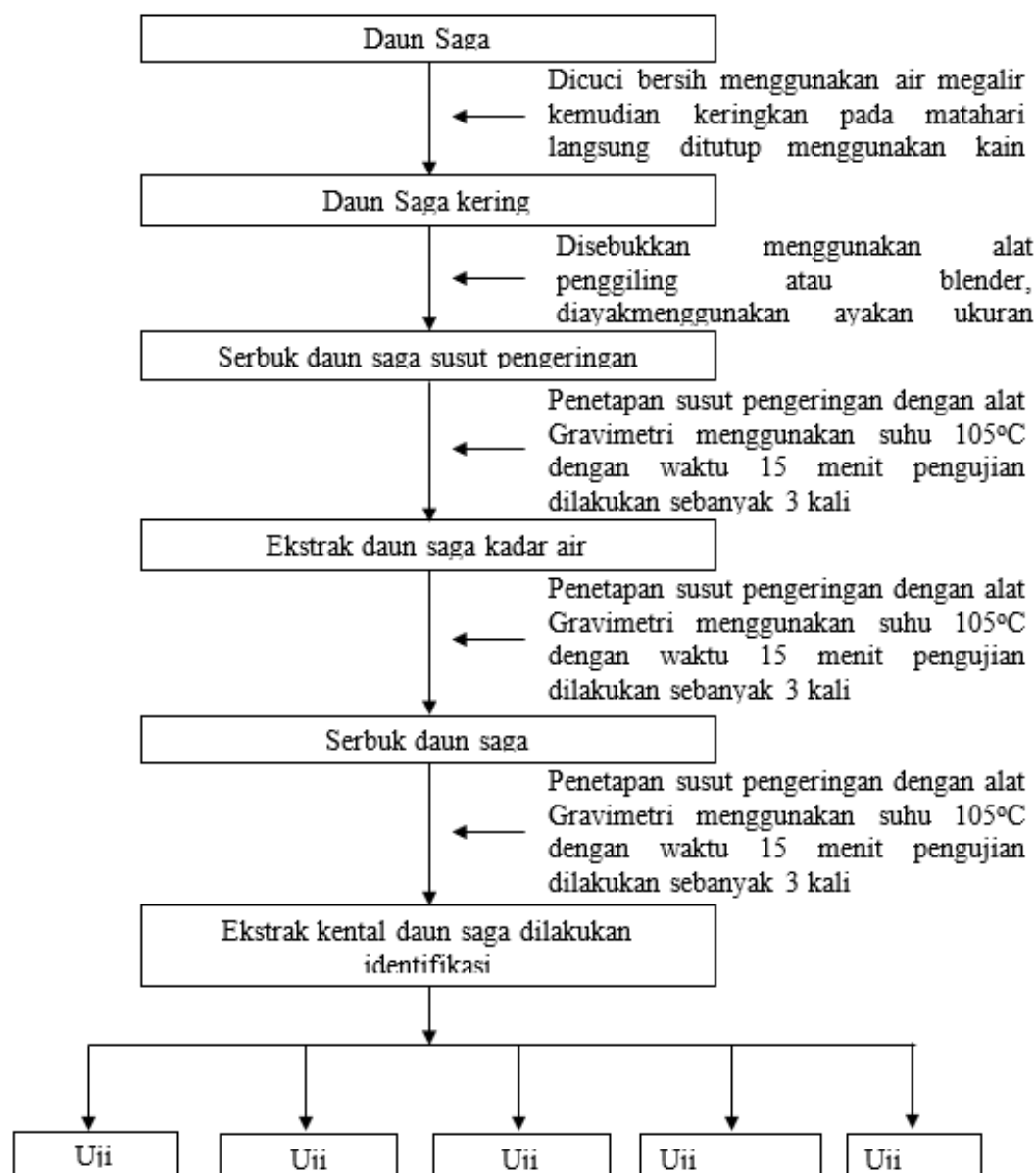
Gambar 3. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema Penelitian



Gambar 6. Skema Penelitian