

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu Penelitian dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli hingga Agustus 2024. Dilakukan pada 5 lokasi berbeda yaitu :

1. Identifikasi tanaman selasih (*Ocimum basilicum* L.) di Laboratorium Herbarium Medanese FMIPA Universitas Sumatera Utara. Jl. Dr. T. Mansur No. 9, Padang Bulan, Kota Medan, Sumatera Utara.
2. Pembuatan ekstrak kental daun tanaman selasih (*Ocimum basilicum* L.) di Laboratorium Bioproses Politeknik Kimia Industri Medan. Jl. Medan Tenggara, No. VII Medan, Sumatera Utara.
3. Uji skrining fitokimia ekstrak daun tanaman selasih (*Ocimum basilicum* L.) di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Hayati Universitas Sumatera Utara. Jl. Tri Dharma, Padang Bulan, Kota Medan, Sumatera Utara.
4. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun tanaman selasih (*Ocimum basilicum* L.) terhadap bakteri jerawat *Propionibacterium acnes* di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sumatera Utara Jl. Dr. T. Mansur No. 9, Padang Bulan, Kota Medan, Sumatera Utara.
5. Uji analisis kadar air dan pengujian pH ekstrak daun tanaman selasih (*Ocimum basilicum* L.) di Laboratorium Fakultas Sains dan Teknologi UINSU Tuntungan Jl. Lap. Golf, Kab Deli Serdang

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Adapun alat yang digunakan pada penelitian ini adalah : Autoklaf, Spektrofotometer, Oven, Maserator, Rotary Evaporator, Inkubator, pH Meter, Cawan Petri, Kaki Tiga, Kertas Auminium, Tabung Reaksi, Kawat Ose, Cotton Swab, Lampu Spiritus, Pipet Tetes, Kertas Cakram, Neraca Digital, Hotplate dan Stirer, Erlenmeyer, Blender, Kertas Label, dan Jangka Sorong.

3.3.2 Bahan

Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah : Tanaman Selasih (bagian daunnya), Bakteri *Propionibacterium acnes*, Alkohol, Aquadest, DMSO 10%, Klindamisin, Media Nutrient Agar, Media NA, Kristal Violet, lugol, Aseton Alkohol, Safranin, FeCl₃ 5%, Mg+HCl, H₂SO₄, NaOH, Meyer, Etanol 96%, Larutan NaCl 0,85% dan Larutan Mcfarland 0,5.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimental kuantitatif laboratorium yang dirancang secara deskriptif melalui berbagai tahap. Metode eksperimental dilakukan untuk melihat apakah ekstrak dengan berbeda konsentrasi yang diberikan peneliti sesuai dengan pengukuran zona hambat yang telah ditetapkan.

3.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan uji metode difusi cakram dengan beberapa konsentrasi dari Larutan ekstrak daun selasih (*Ocimum basilicum* L.) diantaranya konsentrasi (60%, 70%, 80%, 90% dan 100%). Konsentrasi 60% merupakan konsentrasi dari ekstrak kental metanol sebanyak 3 mg yang dilarutkan dengan menggunakan DMSO 10% sebanyak 5 ml tanpa penambahan pelarut aquadest. begitu juga konsentrasi pada konsentrasi yang lainnya. Ditambahkan juga klindamisin sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Identifikasi Sampel Tanaman

Selasih yang digunakan dalam penelitian ini dideterminasi di Laboratorium Herbarium Medanese, FMIPA Universitas Sumatera Utara. Hasil Determinasi menunjukkan bahwa daun tanaman yang digunakan pada penelitian adalah tanaman selasih (*Ocimum basilicum*) dari famili Lamiaceae.

3.5.2. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam uji aktifitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas dan media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit, sedangkan untuk jarum Ose dan pinset disterilisasikan dengan cara dibakar diatas api langsung.

3.5.3. Pembuatan Ekstrak

1. Pembuatan simplisia

Pembuatan daun selasih sebanyak 10 kg yang sudah disortir dan dipilih daun yang layak dibersihkan dengan air mengalir. Daun selasih dipotong lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C-60°C selama 24 jam atau sampai kering. Simplisia disortasi lalu diblender hingga menjadi simplisia serbuk dan diayak dengan menggunakan ayakan mesh 40 lalu ditimbang. Serbuk disimpan dalam wadah yang bersih dan kering.

2. Maserasi

Digunakan perbandingan sebanyak 1 : 10 serbuk daun selasih dengan pelarut etanol 96%. Serbuk daun selasih ditimbang lalu dimasukkan kedalam wadah dan ditambahkan pelarut etanol 96%. Ditungkat dan dimaserasi selama 24 jam.

3. Rotary Evaporator

Larutan ekstrak yang sudah dimaserasi lalu diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator dan dilanjutkan dengan penguapan oven pada suhu 55°C sehingga diperoleh ekstrak kental.

3.5.4. Uji Makroskopik

Uji makroskopik dilakukan dengan melakukan pengamatan secara langsung berdasarkan ciri-ciri organoleptik yang meliputi bau, rasa, warna dan bentuk dari serbuk simplisia daun selasih.

3.5.5. Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Selasih

1. Identifikasi Flavonoid

Larutkan ekstrak daun selasih (*Ocimum basilicum* L.) sebanyak 0,5 gram dan 3 tetes HCl pekat. Apabila positif senyawa flavon terbentuk warna jingga sampai merah, warna merah sampai merah padam menunjukkan flavanol, warna merah padam sampai merah keunguan menunjukkan flavanon.

2. Identifikasi Alkaloid

0,5 gram ekstrak daun selasih dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian tambahkan 2 ml etanol lalu diaduk. Tambahkan 5 ml HCl₂N, dipanaskan pada penagas air. Tunggu sampai dingin, setelah itu disaring dan filtrat ditambahkan beberapa tetes reagen mayer. Sampel diamati, jika keruh atau ada endapan berarti positif mengandung alkaloid.

3. Identifikasi Tanin

0,5 gr ekstrak daun selasih dalam tabung reaksi ditambahkan 2 ml etanol lalu diaduk. Tambahkan 2 ml FeCl₃ 5% pekat dengan cara diteteskan pelan-pelan dari sisi dinding tabung reaksi. Adanya senyawa tanin menunjukkan perubahan warna menjadi coklat pekat.

4. Identifikasi Saponin

0,5 gr ekstrak daun selasih dalam tabung reaksi ditambahkan 2 ml aquadest kemudian dikocok, ditambahkan lagi alkohol 96 % dan HCl₂N. Jika terbentuk busa pada ekstrak berarti positif saponin.

3.6. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

Mueller Hinton Agar (MHA) sebanyak 11,4 gr dilarutkan dalam 300 ml aquadest (38 g/1000 ml) menggunakan erlenmeyer. Setelah itu, dihomogenkan dengan stirer dan alat hot plate sampai mendidih. Media yang telah dihomogenkan kemudian dimasukkan kedalam cawan petri steril 25 ml.

3.7. Pembuatan Larutan NaCl

NaCl sebanyak 8,5 gram ditimbang kemudian dilarutkan kedalam aquadest steril sebanyak 1000 ml.

3.8. Peremajaan Bakteri

Isolat bakteri *Propionibacterium acnes* diambil sebanyak 1 kali menggunakan jarum ose dan digores ke media MHA miring secara aseptik, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C dan disimpan sebagai stok isolat.

3.9. Pewarnaan Gram

Siapkan preparat yang sudah berisi bakteri *Propionibacterium acnes* secara melingkar yang dibuat dengan diameter 2-3 cm lalu difiksasi diatas api spiritus hingga kering. Preparat dituang secara merata oleh cairan pewarna kristal violet dan ditunggu selama 1 menit lalu, preparat dimiringkan untuk dibilas dengan sedikit air mengalir. Setelah itu cairan lugol dituang pada preparat dan ditunggu selama 30 detik, preparat dibilas kembali dengan posisi miring pada sedikit air mengalir kemudian lakukan dekolorisasi dengan meneteskan cairan aseton alkohol sedikit demi sedikit selama 15 detik lalu dibilas kembali dan yang terakhir safranin dituang pada preparat dan ditunggu selama 1 menit dan preparat dibilas kembali dengan air mengalir, dikeringkan dan ditetesi imersi oil.

Preparat dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali.

3.10. Standar Kekeruhan Mc. Farland 0,5

Bakteri yang sudah diregenerasi disuspensi dengan melurukannya dengan larutan NaCl 0,85% kekeruhannya lalu dibandingkan dengan larutan Mc Farland 0,5. suspensi dimasukkan kedalam kuvet diukur dengan spektrofotometer (panjang gelombang 600nm, absorbansi = 0,1 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml).

3.11. Pembuatan Suspensi Bakteri *Propionibacterium acnes*

Bakteri uji *Propionibacterium acnes* yang telah diinokulasi pada media agar kemudian diambil dengan kawat Ose steril lalu disupensikan kedalam tabung yang berisi 5 ml larutan NA.

3.12. Uji Kadar Air

Penetapan kadar air ekstrak dilakukan dengan cara metode gravimetri. Ekstrak yang sudah di maserasi dan diperoleh filtratnya disisihkan terlebih dahulu. Lalu dengan menimbang cawan petri kosong yang sudah dipanaskan terlebih dahulu untuk mengetahui berat wadahnya, lalu dimasukkan lebih kurang 2 gram filtrat ekstrak kedalam cawan petri yang telah ditara kemudian ditimbang lagi agar terlihat bobot filtrat yang ditambahkan dengan berat cawan petrinya. Setelah ekstrak ditimbang kemudian dikeringkan diatas api bunsen dan ditimbang sekali lagi bobot ekstrak dan cawan petri setelah proses pemanasan. Lalu setelah semua prosedur selesai dikerjakan, kemudian dihitung besar susut pengeringan pada ekstrak daun selasih dengan rumus perhitungan %kadar air :

$$\frac{b-(c-a)}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

a = berat cawan petri kosong (gram)

b = berat sampel awal (gram)

c = berat cawan + sampel akhir (gram)

Metode penetapan kadar air simplisia menggunakan metode gravimetri karena caranya yang sederhana dan hemat biaya. Penetapan kadar air dilakukan dengan memanaskan simplisia pada suhu 105°C. Penggunaan suhu 105°C karena air menguap pada suhu 100°C, dengan suhu 105°C maka kandungan air dalam sel sebagian besar sudah menguap. Sebelum ditimbang simplisia didinginkan dengan desikator karena suhu tinggi benda akan memuai, maka mempengaruhi bobot benda.

Penetapan kadar air simplisia dilakukan dengan cara gravimetri. Daun selasih ditimbang kurang lebih 2 g dimasukan kedalam petridish yang telah ditara. Daun selasih dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam, dan timbang. Daun selasih dilanjut pengeringan dan ditimbang pada selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Departemen Kesehatan, 2017).

3.13. Uji Aktivitas

Uji aktivitas ekstrak daun selasih terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dengan merendam kertas cakram kedalam sediaan ekstrak etanol daun selasih dengan konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, klindamisin sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif selama 10 menit. Dilakukan uji dayahambat bakteri *Propionibacterium acnes* yang sudah diukur dengan cara di streak secara metode langsung (zig zag) ke cawan petri berisi media NA yang sudah menjendal menggunakan cotton swab steril Selanjutnya kertas cakram yang sudah direndam dengan sediaan ekstrak etanol daun selasih diletakkan pada pembukaan media agar padat yang sudah ditandai. Media dibungkus kertas dan diinkubasi pada inkubator suhu 37°C selama 24 jam. Amati dan hitung zona hambat bakteri menggunakan penggaris untuk mengukur diameter zona hambat bakterinya (bening).

Rumus perhitungan zona hambat :

$$\frac{\text{Diameter Zona Hambat} - \text{Diameter Cakram}}{\text{Diameter Cakram}} =$$

Tabel 3.1. Perlakuan Uji Aktivitas

Perlakuan Ekstrak Kental Daun Selasih	Ulangan		
	Perlakuan I	Perlakuan II	Perlakuan III
Kontrol + (klindamisin)	-	-	-
Kontrol - (DMSO 10%)	-	-	-
Konsentrasi 60%	-	-	-
Konsentrasi 70%	-	-	-
Konsentrasi 80%	-	-	-
Konsentrasi 90%	-	-	-
Konsentrasi 100%	-	-	-

3.14. Uji pH

Pengukuran pH menggunakan alat pH meter yang sebelumnya dibilas dengan aquadest, kemudian dikeringkan dengan tissue. Alat pH meter dimasukkan kedalam sediaan ekstrak daun selasih (*Ocimum basilicum* L.) kemudian ditunggu hingga stabil.

3.15. Analisis Data

Data pada penelitian didapat dengan cara pengamatan secara visual dan mengukur hasil rata-rata zona hambat disekitar cakram berisi larutan dari beberapa konsentrasi ekstrak terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* menggunakan jangka sorong. Data yang diperoleh kemudian diuji dengan menggunakan uji sensitivitas metode Kirby-Bauer.

3.16. Alur Prosedur Penelitian

