

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah Eksperimental. Penelitian Eksperimental menurut Sugiyono (2012) merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh dari perlakuan tertentu terhadap yang lainnya dalam kondisi yang terkendalikan. Pada penelitian ini digunakan rancangan acak lengkap. Bentuk rancangan yang digunakan dapat dilihat pada tabel berikut:

**Tabel 2.**  
**Rancangan Acak Lengkap**

| Perlakuan<br>(P) | Pengulangan     |                 |                 |                 |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  | 1               | 2               | 3               | 4               |
| P0               | P0 <sub>1</sub> | P0 <sub>2</sub> | P0 <sub>3</sub> | P0 <sub>4</sub> |
| P1               | P1 <sub>1</sub> | P1 <sub>2</sub> | P1 <sub>3</sub> | P1 <sub>4</sub> |
| P2               | P2 <sub>1</sub> | P2 <sub>2</sub> | P2 <sub>3</sub> | P2 <sub>4</sub> |
| P3               | P3 <sub>1</sub> | P3 <sub>2</sub> | P2 <sub>3</sub> | P3 <sub>4</sub> |
| P4               | P4 <sub>1</sub> | P4 <sub>2</sub> | P4 <sub>3</sub> | P4 <sub>4</sub> |
| P5               | P5 <sub>1</sub> | P5 <sub>2</sub> | P5 <sub>3</sub> | P5 <sub>4</sub> |

#### Keterangan:

P0 : Pemberian Akuades sebagai kontrol negatif

P1: Pemberian Kloramfenikol sebagai kontrol positif

P2: Pemberian ekstrak daun kemangi konsentrasi 20%

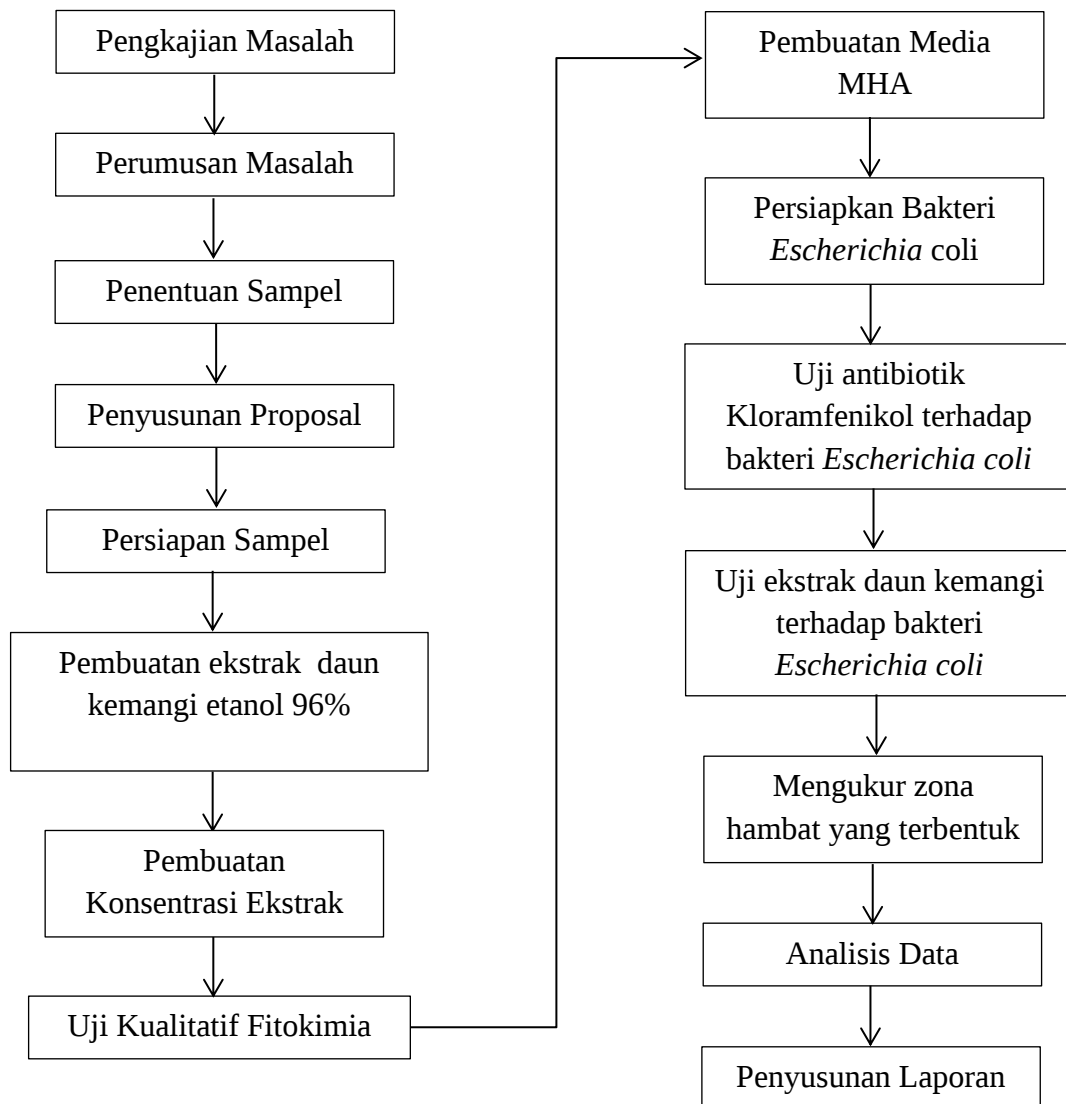
P3: Pemberian ekstrak daun kemangi konsentrasi 40%

P4 : Pemberian ekstrak daun kemangi konsentrasi 60%

P5 : Pemberian ekstrak daun kemangi konsentrasi 80%

## B. Alur Penelitian

Alur Penelitian pada penelitian ini sesuai dengan bagan diibawah ini:



## C. Tempat dan Waktu Penelitian

### 1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Pertanian dan Laboratorium Biomedik FKIK Universitas Warmadewa.

### 2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2023 sampai April 2024.

#### **D. Sampel penelitian**

##### **1. Sampel penelitian**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum L.*) yang sudah melewati tahapan evaporasi. Daun kemangi diperoleh di Pasar Badung, Denpasar. Daun kemangi (*Ocimum sanctum L.*) dipilih menurut kriteria inklusi yang telah ditetapkan peneliti yaitu bagian yang berwarna hijau, tidak berlubang, Ekstrak kemangi menggunakan etanol 96% kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak pekat kemangi.

##### **2. Besar dan jumlah sampel**

Jumlah daun kemangi yang digunakan untuk sampel basah masing-masing sebanyak 1kg lalu disortasi kemudian dikeringkan dan diayak sehingga diperoleh 300gr. Pada penelitian ini sampel yang diuji adalah ekstrak daun kemangi dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% yang dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak daun kemangi menggunakan pelarut etanol etanol 96% sebagai kelompok perlakuan, kontrol positif digunakan antibiotik Kloramfenikol 0,001 g, dan kontrol negatif digunakan Akuades. Sehingga jumlah total perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 6 perlakuan. Pada masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan pada masing-masing variasi konsentrasi dihitung menggunakan rumus Federer sebagai berikut :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

$r$  = jumlah pengulangan

$t$  = jumlah perlakuan

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 15+5$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan diatas, pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak empat kali. Menurut Hanafiah (2016), jumlah minimal pengulangan yang digunakan dalam penelitian laboratorium adalah tiga kali pengulangan. Pada penelitian ini menggunakan empat perlakuan dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% masing-masing konsentrasi dilakukan empat kali pengulangan.

### 3. Unit analisis

Unit analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah zona hambat berbagai konsentrasi ekstrak daun kemangi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada berbagai konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80%.

## E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

### 1. Jenis data yang dikumpulkan

Data yang dikumpulkan berupa data primer dan data sekunder. Data primer didapatkan dengan melakukan eksperimen laboratorium. Data diperoleh dari hasil pengukuran diameter zona hambat pada pertumbuhan *Escherichia coli* yang dihasilkan oleh ekstrak daun kemangi. Data sekunder berupa jurnal dan dokumen terkait.

## 2. Teknik pengambilan data

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini adalah pengukuran zona hambat pertumbuhan E.coli yang dihasilkan oleh ekstrak daun kemangi dalam berbagai konsentrasi. Hasil pengukuran tersebut dinyatakan dalam satuan millimeter (mm).

## 3. Instrumen pengumpulan data

Dalam penelitian ini instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data yakni jangka sorong, alat tulis, kamera, dan alat laboratorium.

# **F. Alat, Bahan dan Prosedur Kerja**

## 1. Alat

Alat yang digunakan adalah sebagai berikut, autoclave (HVE-50 Hirayama), neraca analitik (RADWAG), biosafety cabinet (Biobase), hotplate (Jisico), gelas ukur (Pyrex Iwaki) 250 ml dan 100 ml masing-masing 1 buah, erlenmeyer (Schott Duran) 500 ml, beaker glass (Pyrex Iwaki) 1000 ml, pipet ukur (Pyrex Iwaki) 1ml, 5ml dan 10 ml masing-masing 1 buah, ball pipet (Marienfield) 1 buah, batang pengaduk, petridish steril 11 buah, jangka sorong 1 buah, mikropipet (Socorex) 2µl-20µl 1 buah, white tip 15 buah, McFarland densitometer (Den-18) 1 buah, lampu spiritus 1 buah, korek api 1 buah, incubator (Esco Isotherm), ose, tabung reaksi (Iwaki) 8 buah, rak tabung reaksi 2 buah dan alat tulis, vortex (IKA VORTEX GENIUS 3).

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kemangi, etanol 96%, bakteri *Escherichia coli*, media Mueller Hinton Agar (Oxoid), standar 0,5 Mc Farland, larutan NaCl fisiologis 0,9%, Alkohol 70%, White tips (15 buah), kapas berlemak, aluminium foil, dan kertas saring.

## 3. Prosedur Kerja

### a. Pembuatan larutan kontrol positif dan kontrol negatif

- 1) Kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol 0,001g.dibuat dengan cara melarutkan serbuk kloramfenikol 0,001g dalam 1 ml akuades. .
- 2) Volume sumuran yang dibuat adalah 50  $\mu$ l.
- 3) Kontrol negatif menggunakan akuades.

### b. Persiapan daun kemangi

- 1) Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kemangi yang dibeli dari Pasar Badung, Kota Denpasar.
- 2) Sampel dibersihkan menggunakan air bersih dan mengalir hingga semua kotoran hilang.
- 3) Setelah bersih daun kemangi dikeringkan dengan cara didiamkan beberapa saat sambil diangin-anginkan hingga tidak ada lagi air yang tersisa (Armansyah, Sutriana dan Hanif, 2022)

### c. Pembuatan sediaan serbuk daun kemangi

- 1) Daun kemangi dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran.
- 2) Lalu daun kemangi kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih.
- 3) Selanjutnya dikeringkan dibawah sinar matahari/memgggunakan oven
- 4) Dihaluskan menggunakan blender hingga didapat serbuk simplisia yang halus.

- 5) Serbuk simplisia disimpan dalam wadah bersih, kering, dan tertutup rapat (Amini, Tivani dan Santoso, 2019)

d. Pembuatan sediaan ekstrak daun kemangi

Maserasi adalah metode ekstraksi dengan cara merendam sampel (simplisia) dalam pelarut dengan atau tanpa pengadukan. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara zat aktif di dalam dan di luar sel, sehingga senyawa metabolit di dalam sitoplasma akan terdesak keluar dan larut dalam pelarut organik (Lestari, Ardiningsih dan Nurlina, 2016)

- 1) Serbuk daun kemangi tersebut kemudian dimaserasi atau direndam dengan menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 x 24 jam menggunakan suhu kamar.
- 2) Dilakukan pengadukan setiap hari. Setiap 1 x 24 jam
- 3) Simplisia yang telah dimaserasi dengan etanol 96% disaring sehingga didapatkan filtrat.
- 4) Setelah didapatkan filtrat dengan jumlah maksimum, filtrat diuapkan dengan menggunakan alat evaporator untuk memisahkan ekstrak dan pelarut.
- 5) Sehingga didapatkan ekstrak daun kemangi yang pekat dan kental.

e. Uji bebas etanol

- 1) Uji bebas etanol 96% dilakukan dengan menambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat dibantu dengan pemanasan.
- 2) Ekstrak dinyatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Ristiayani, 2015; Amini, Tivani dan Santoso, 2019).

- f. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak daun kemangi (Haryanti *et al.*, 2020)
- 1) Menggunakan konsentrasi ekstrak daun kemangi 20%, 40%, 60%, dan 80% masing-masing konsentrasi tersebut dibuat dengan cara penimbangan ekstrak pekat daun kemangi dengan akuades.
  - 2) Membuat seri konsentrasi ekstrak daun kemangi dibuat dengan menimbang stok sampel (ekstrak pekat) sesuai perhitungan menggunakan presentase perbandingan konsentrasi % (b/v) yang dapat ditentukan melalui rumus berikut:

$$\% = \frac{b}{v} \times 100$$

Keterangan :

% : variasi konsentrasi (%) ekstrak daun kemangi

b : massa ekstrak daun kemangi (100%)

v : volume pelarut.

**Tabel 3.**  
**Variasi Konsentrasi**

| No. | Konsentrasi (%) | Ekstrak Daun Kemangi | Akuades (ml) |
|-----|-----------------|----------------------|--------------|
|     |                 | Pekat 100% (gram)    |              |
| 1.  | 20%             | 0,2                  | 0,8          |
| 2.  | 40%             | 0,4                  | 0,6          |
| 3.  | 60%             | 0,6                  | 0,4          |
| 4.  | 80%             | 0,8                  | 0,2          |

- 3) Melakukan campuran pada masing-masing konsentrasi dihomogenkan dan disimpan dalam refrigerator

g. Uji Kualitatif Fitokimia

1) Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara dimasukkan 1 ml ekstrak kedalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes asam klorida (HCl) pekat dan serbuk magnesium (Mg) kemudian dikocok. Hasil uji akan menunjukkan warna merah atau cokelat jika positif terdapat flavonoid (Alamsyah *et al.*, 2014)

2) Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara dimasukkan 2 ml ekstrak kedalam tabung reaksi dan ditambahkan akuades panas kemudian dikocok kuat selama 10 menit dan didiamkan selama 5menit. Kemudian ditetaskan 1 etes HCl 2N, jika terdapat saponin maka buih akan stabil (Alamsyah *et al.*, 2014)

3) Tanin

Uji tanin dilakukan dengan cara dimasukkan ekstrak sebanyak 3 ml direaksikan dengan 3 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> maka akan terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan jika terdapat kandungan tanin (Simaremare, 2014)

4) Alkaloid

Uji ini dilakukan dengan cara dimasukkan 3 ml ekstrak ditambahkan beberapa tetes asam sulfat 2N atau asam klorida 2N, bagi larutan sampel menjadi 2 bagian, tambahkan satu bagian dengan 1-2 tetes reagen Mayer dan Wagner, tambahkan 1-2 tetes reagen Dragendorff ke dalam bagian yang lain. Lalu amati perubahan yang terjadi. Bila positif terbentuk endapan merah-jingga dengan reagen Dragendorff dan terbentuk endapan putih kekuningan dengan reagen Mayer dan Wagner.

- h. Prosedur pembuatan media uji Mueller Hinton agar (MHA) (Syarifah *et al.*, 2018)
- 1) Menimbang bubuk media Mueller Hinton Agar sebanyak 10,64 gram menggunakan neraca analitik.
  - 2) Memindahkan bubuk media ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 280 ml akuades.
  - 3) Melakukan pemanasan media dengan hotplate dan diaduk hingga homogen.
  - 4) Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak dan aluminium foil.
  - 5) Mensterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dihitung dari tercapainya suhu 121°C.
  - 6) Media yang telah disterilisasi, didiamkan sampai suhu media turun menjadi 40-50°C.
  - 7) Menuangkan media secara aseptis ke dalam cawan petri dengan volume 25 ml, kemudian didiamkan hingga memadat.
  - 8) Setelah media memadat, cawan petri dibalik, dan apabila tidak langsung digunakan media yang sudah dituangkan pada cawan petri disimpan didalam refrigerator.
- i. Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* (Amalia & Febriawan , 2021)
- 1) Mengambil koloni bakteri *Escherichia coli* dari hasil peremajaan diambil beberapa ose dan disuspensikan kedalam tabung reaksi berisi 5 ml larutan NaCl Fisiologis 0,9% steril sampai memperoleh konsentrasi 0,5 McFarland.
  - 2) Membaca kekeruhan suspensi bakteri dibaca dengan menggunakan McFarland densitometer. 0,5 McFarland setara dengan  $1,5 \times 10^8$  (Unit Pembentuk Koloni) CFU/ml.

j. Tahapan pemeriksaan

- 1) Menyiapkan suspensi bakteri *Escherichia coli* yang telah dibuat.
- 2) Mencelupkan cotton swab steril dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri tersebut.
- 3) Memeras cotton swab steril dengan cara menekannya pada dinding dalam tabung dan diangkat.
- 4) Melakukan inokulasi pada media Mueller Hinton Agar (MHA), goresan dilakukan secara merata hingga menutupi seluruh permukaan media.
- 5) Melakukan inokulasi media Mueller Hinton Agar (MHA) dengan suspensi bakteri *Escherichia coli* didiamkan selama 15 menit agar suspensi bakteri meresap kedalam agar.
- 6) Selanjutnya dibuat sumur pada cawan petri dengan diameter masing-masing sumur sebesar 6 mm.
- 7) Masing-masing larutan uji konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% dimasukkan sebanyak 50 µl ke dalam sumur
- 8) Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati zona bening yang terbentuk.

k. Pelaporan hasil

- 1) Melihat zona hambat yang terbentuk yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar sumuran.
- 2) Mengukur zona hambat menggunakan jangka sorong dari sisi yang satu ke sisi yang lain melalui tengah-tengah sumur dan dilaporkan dengan satuan millimeter (mm).

## **G. Pengolahan dan Analisis Data**

### **1. Teknik pengolahan data**

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun kemangi terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang dinyatakan dalam satuan millimeter (mm) diolah menggunakan teknik tabulating data yaitu data yang disajikan dalam bentuk tabel naratif.

### **2. Analisis data**

Data yang telah diperoleh lalu dianalisis dengan uji statistik dengan bantuan *software* komputer. Data diuji dengan menggunakan Uji Kolmogorov-Smirnov (KS) dimana pengujian ini dilakukan untuk mengetahui normalitas data. Apabila data berdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji One Way Anova untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan zona hambat pertumbuhan *Escherichia coli*.

Jika ada perbedaan zona hambat, dilanjutkan dengan uji LSD (Least Significant Deference). Uji ini digunakan untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* apabila data berdistribusi normal. Apabila data tidak berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

## **H. Etika Penelitian**

Dalam penelitian ini prinsip etika yang diterapkan adalah *beneficence*, yaitu prinsip kebijakan, mendatangkan manfaat dan meminimalkan kerugian bagi orang lain.

Serta prinsip *Non maleficence*, yaitu dimaksudkan untuk memastikan bahwa subjek penelitian tidak dianggap merugikan dan memberikan perlindungan terhadap penyalahgunaan.