

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan secara eksperimental. Penelitian eksperimental merupakan suatu penelitian kuantitatif dengan melakukan kegiatan percobaan (eksperimental) tertentu (Notoatmodjo, 2018). Menurut Sugiyono (2019) bahwa penelitian eksperimental digunakan untuk mengetahui pengaruh variabel independen (perlakuan) terhadap variabel dependen (hasil) dalam kondisi yang terkendalikan (kelompok kontrol).

Penelitian ini dilakukan dengan melakukan formulasi sediaan *mouthwash* ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) sebagai zat aktif dengan variasi konsentrasi ekstrak 2%, 2,5% dan 3%, kemudian evaluasi sediaan *mouthwash* pada penelitian ini berupa evaluasi organoleptik, pH dan viskositas, selanjutnya dilakukan uji aktivitas (daya hambat) dari sediaan *mouthwash* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* menggunakan metode difusi cakram selanjutnya hasil data akan dianalisis.

#### **B. Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada beberapa laboratorium pada bulan Mei-Juni 2023, diantaranya:

1. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro.

2. Pembuatan ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan uji fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
3. Pembuatan sediaan *mouthwash* ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan uji evaluasi sediaan dilakukan di Laboratorium Teknologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo
4. Uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans* menggunakan metode difusi cakram dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo

#### **C. Subyek Penelitian**

Pada penelitian ini digunakan sampel daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) yang didapatkan dari Desa Negeri Katon, Kecamatan Marga Tiga, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung.

#### **D. Definisi Operasional**

Definisi operasional pada penelitian ini yaitu :

1. Daun kemangi yang menjadi sampel (*Ocimum basilicum* L.) ialah daun kemangi yang masih segar berwarna hijau dan diperoleh dari Desa Negeri Katon, Kec. Marga Tiga, Kab. Lampung Timur, Provinsi Lampung.
2. Konsentrasi daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) yang digunakan adalah 2%, 2,5% dan 3%.
3. Pengujian yang dilakukan pada sediaan *mouthwash* meliputi uji organoleptik, pH, viskositas dan uji aktivitas antibakteri.

4. Metode difusi cakram digunakan sebagai metode untuk menguji aktivitas antibakteri sediaan *mouthwash*.

## E. Variabel Penelitian

### 1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang tidak dipengaruhi oleh variabel lain. Pada penelitian ini variabel bebasnya yaitu konsentrasi sediaan *mouthwash* ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) 2%, 2,5% dan 3%.

### 2. Variabel terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi oleh adanya variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu evaluasi sediaan *mouthwash* seperti organoleptik, pH, viskositas serta pengukuran diameter zona hambat terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

### 3. Variabel terkendali/ kontrol

Variabel terkendali/kontrol adalah variabel/ faktor lain yang ikut berpengaruh dan sengaja dikendalikan. Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu alat, bahan, ruangan dan kondisi laboratorium :

- a. Pada sterilisasi alat dan bahan menggunakan oven dengan suhu 170°C selama 2 jam dan autoklaf 121°C selama 15 menit.
- b. Pada pemekatan ekstrak daun kemangi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 30°C-50°C
- c. Suhu inkubasi pada uji aktivitas antibakteri sediaan *mouthwash* pada suhu 37 °C

## F. Pengumpulan Data

### 1. Alat :

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu neraca analitik (excellent), kaca arloji, kertas perkamen, cawan porselen, mortir dan stamper, batang pengaduk, *waterbath* (faithful), corong (iwaki), *viskometer brookfield* (DV2T), pH digital (starter 3100), kain kasa, gelas ukur (iwaki), *beaker glass* (iwaki), Erlenmayer (iwaki), sudip, spatula, blender, pengayak no.40, *rotary evaporator* (RE 2000E), wadah pencuci mulut, oven (binder), toples kaca untuk maserasi, mikropipet (socorex), pipet ukur, pembakar bunsen, hot plate/ kompor listrik (maspion), tabung reaksi (iwaki), rak tabung, jarum ose, autoklaf (hirayama), inkubator (binder), *Mc. Farland* densitometer (biosan), *vortex mixer* (D-LAB) dan kapas.

### 2. Bahan :

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.), etanol 70% (*technical grade*), gliserin (*food grade*), propilenglikol (*food grade*), natrium sakarin, mentol, oleum basil, aquadest, reagen fitokimia (reagen mayer, reagen dragendroff, reagen bauchardat, reagen  $\text{FeCl}_3$ , reagen NaOH dan reagen HCl), larutan NaCl 0,9%, standar *Mc.Farland* 0,5, *aluminium foil*, kertas cakram/ *paper disc* (*blank disc* dan *antibiotic disc* (oxoid), bakteri *Streptococcus mutans* (Undip) dan media NA (*Nutrient Agar*) (merck).

### 3. Prosedur Kerja :

#### a. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro untuk mengetahui kebenaran terkait daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.).

#### b. Pembuatan simplisia daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.)

Daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) yang telah disiapkan sebanyak 1500 gram dilakukan proses sortasi basah, setelah itu daun dicuci dengan air mengalir dan dilakukan perajangan pada tempat yang telah disiapkan. Lalu dilanjutkan proses pengeringan dibawah sinar matahari dengan bantuan penutup kain berwarna hitam. Setelah daun mengering, dilakukan proses sortasi kering kemudian daun yang telah kering dihaluskan menggunakan blender dan serbuk hasil blender diayak menggunakan ayakan mesh no 40 (Wijaya dan Noviana, 2022).

#### c. Ekstraksi daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.)

Ekstraksi daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) menggunakan metode maserasi dengan cara dimasukkan 500 gram serbuk daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) ke dalam toples kaca maserasi yang telah disiapkan, kemudian ditambahkan 2500 mL etanol 70% pada toples kaca, lalu tutup menggunakan *aluminium foil*, selanjutnya direndam larutan tersebut dan didiamkan selama 3 x 24 jam dengan

disimpan pada tempat yang terhindar dari cahaya matahari (dilakukan pengadukan). Setelah 3 hari ampas disaring dan dipisahkan hasil pada toples kaca yang berbeda lalu dilakukan remaserasi/ pengulangan. Hasil maserasi dan remaserasi dikumpulkan, kemudian maserat dipisahkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 30°C - 50°C. Kemudian hasil yang telah dievaporasi, diuapkan dengan menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak yang kental.

d. Uji Kadar Air

Pengujian kadar air menggunakan metode gravimetri dengan cara ditimbang sebanyak 1-2 gram ekstrak dalam cawan yang telah ditara, lalu dipanaskan cawan menggunakan oven dengan suhu 105°C selama 5 jam kemudian ditimbang kembali (Lestari, Suhaimi & Wildaniah, 2018). Kadar air yang baik ditetapkan sebagai persyaratan yaitu dengan persentase <10% (Purwoko, Syamsudin & Simanjutak, 2020).

e. Uji fitokimia

1) Uji flavonoid

Ekstrak daun kemangi sebanyak 10 mg ditambah 5 mL etanol dan beberapa tetes reagen  $\text{FeCl}_3$ . Jika terdapat perubahan warna menjadi biru, ungu, hijau, merah maupun hitam positif mengandung flavanoid. Apabila sampai 20 tetes  $\text{FeCl}_3$  belum terjadi perubahan warna maka flavonoid negatif (Kumalasari & Andiarna, 2020).

## 2) Uji alkaloid

Ekstrak daun kemangi sebanyak 10 mg ditambah 1 mL HCl + 9 mL air dipanaskan selama 2 menit, dinginkan lalu saring. Diambil 3 tetes filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer/ dragendroff/ bauchardat. Positif alkaloid dengan adanya endapan putih/ kekuningan (mayer), endapan merah jingga/ oren (dragendroff), endapan coklat sampai kehitaman (bauchardat) (Yuniarti & Khairina, 2022).

## 3) Uji saponin

Ekstrak daun kemangi sebanyak 0,5 gram dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 mL air panas dan dikocok kuat-kuat hingga 10 detik. Uji positif adanya saponin ditandai dengan terbentuknya busa/ buih selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl buih tidak hilang (Rachman, Wardatun & Weandarlina, 2018).

## 4) Uji tanin

Ekstrak daun kemangi sebanyak 0,5 gram direbus di dalam 20 mL akuades di dalam tabung reaksi. Saring dan tambahkan beberapa tetes 0,1%  $\text{FeCl}_3$  sampai berubah warna. Hasil dikatakan positif mengandung tanin apabila ditandai dengan munculnya warna hijau kecoklatan atau warna biru hitam (Kumalasari & Andiarna, 2020).

f. Formulasi sediaan *mouthwash*

Formulasi sediaan *mouthwash* ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dimulai dengan membuat rancangan formula dasar *mouthwash*. Rancangan formula berdasarkan peneliti Rasyadi (2018) dapat dilihat pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Formula Sediaan *mouthwash*

Komposisi	Fungsi	Formula (%)			
		F0	F1	F2	F3
Ekstrak	Bahan/ Zat aktif	-	2	2,5	3
Etanol 70%	Pelarut	qs	Qs	qs	qs
Gliserin	<i>Cosolvent</i>	7,5	7,5	7,5	7,5
Propilenglikol	<i>Cosolvent</i>	5	5	5	5
Natrium sakarin	Pemanis	0,05	0,05	0,05	0,05
Menthol	<i>Corigens odoris</i>	0,125	0,125	0,125	0,125
Oleum basil	<i>Corigens odoris</i>	q.s	q.s	q.s	q.s
Aquades hingga	Pelarut	100%	100%	100%	100%

**Keterangan:**

Formula K- : Formula *Mouthwash* tanpa konsentrasi ekstrak daun kemangi

Formula F1 : Formula *Mouthwash* dengan konsentrasi ekstrak daun kemangi 2%

Formula F2 : Formula *Mouthwash* dengan konsentrasi ekstrak daun kemangi 2,5%

Formula F3 : Formula *Mouthwash* dengan konsentrasi ekstrak daun kemangi 3%

Prosedur dalam pembuatan sediaan *mouthwash* diawali dengan menyiapkan semua bahan yang akan digunakan. Semua masing-masing bahan ditimbang sesuai dengan tabel 3.1, lalu dikalibrasi botol wadah sediaan *mouthwash* dan diberi tanda. Ekstrak daun kemangi dilarutkan dengan etanol 70% secukupnya sekitar 1 mL, ditambahkan propilenglikol dan gliserin diaduk sampai melarut, lalu dimasukkan dalam Erlenmeyer. Dimasukkan mentol dalam mortir lalu ditambahkan etanol 70% secukupnya 2-3 tetes, kemudian digerus



dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, lalu dimasukkan natrium sakarin ke dalam *beaker glass* lalu ditambahkan dengan aquadest secukupnya 2-3 tetes, diaduk hingga melarut menggunakan batang pengaduk, lalu dimasukkan dalam Erlenmeyer. Setelah itu, diaduk semua bahan yang telah tercampur dalam Erlenmeyer sampai homogen, kemudian dimasukkan ke dalam wadah dan ditambahkan aquadest sampai sampai tanda batas, serta ditambahkan oleum *basil* 1-2 tetes dan ditutup wadah *mouthwash* dengan rapat, dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

g. Evaluasi Uji Sediaan

1) Uji organoleptik

Uji organoleptik bertujuan untuk mengamati adanya perubahan bentuk, bau dan warna. Uji ini menggunakan indra manusia seperti indra penglihatan dan penciuman (Marpaung & Septiyani, 2020). Uji organoleptik pada penelitian berupa bentuk, warna dan bau. Parameter bentuk dan warna menggunakan indra penglihatan, sedangkan parameter bau menggunakan indra penciuman.

2) Uji pH

Uji pH bertujuan untuk mengamati pH sediaan *mouthwash* apakah memiliki rentang dengan pH mulut (5,5–7,9). Uji ini menggunakan pH meter digital (Handayani, Sundu & Sari, 2017). Pengujian pH meter dilakukan kalibrasi terlebih dahulu dengan

cara elektroda dimasukkan ke dalam larutan standar buffer pada pH 4, 7 dan 10 lalu dibilas menggunakan aquadest selanjutnya untuk pengukuran pH meter dengan cara dicelupkan elektroda dalam sediaan *mouthwash* (BSN, 2022)

### 3) Uji viskositas

Uji viskositas menggunakan *viskometer brookfield* digunakan untuk mengetahui tingkat viskositas sediaan *mouthwash*. Pengujian viskositas dengan cara menekan on/ off pada alat lalu ditunggu hingga muncul autozero complete kemudian dipasangkan spindle no 61 dengan rpm 100 rpm dalam waktu 1 menit dan dimasukkan spindle tersebut dalam sampel sampai terendam lalu ditekan run serta dicatat hasil pengujian (S, F. E. & Harun, N., 2022). Syarat viskositas sediaan *mouthwash* yaitu <7,25 cP (Ahmad, Junita & Yusuf, 2022).

### h. Uji aktivitas antibakteri pada *Streptococcus mutans*

#### 1) Sterilisasi

Pada uji antibakteri, perlakuan harus dalam keadaan yang steril, sehingga semua alat dan bahan yang digunakan harus dalam keadaan steril. Tujuan dari sterilisasi ini untuk membunuh mikroorganisme yang ada pada alat dan bahan, agar tidak mengganggu jalannya sebuah penelitian. Sterilisasi media dan alat yang tidak tahan pemanasan dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan sterilisasi alat yang

terbuat dari kaca/ tahan pemanasan menggunakan oven pada suhu 170°C selama 2 jam dan jarum ose disterilkan dengan cara dipijarkan menggunakan lampu bunsen/ spiritus (Ismail *et al.*, 2020).

## 2) Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA) (Merck)

Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA) (merck) dilakukan dengan cara ditimbang 2 gram media *Nutrient Agar* dimasukkan ke dalam Erlenmeyer lalu ditambahkan dengan 100 mL aquadest kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* sampai homogen agar media larut sempurna lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Novianty *et al.*, 2020).

## 3) Pembuatan Media Agar Miring

Sebanyak 5 mL media *Nutrient Agar* (NA) dituangkan masing-masing ke dalam tabung reaksi yang telah steril dan ditutup dengan *aluminium foil*. Selanjutnya diletakkan dengan kemiringan yang diinginkan sampai media tersebut memadat. Media agar miring digunakan saat inokulasi bakteri (Junaedi, 2022).

## 4) Inokulasi Bakteri pada Media Agar Miring

Bakteri uji diambil menggunakan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggores. Kemudian diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Handayani, Sundu & Sari, 2017).

#### 5) Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan jarum ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 10 mL larutan NaCl 0,9% kemudian dibandingkan menggunakan alat *Mc. Farland Densitometry* hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan pada *Mc. Farland* 0,5 (Rizki *et al.*, 2021).

#### 6) Proses uji aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri diawali dengan kertas cakram direndam ke dalam sampel (F1, F2, F3 dan K-). K- berupa sediaan *mouthwash* tanpa ekstrak daun kemangi dan K+ berupa *disc* antibiotik *doxycycline*. Setelah kertas cakram direndam lalu dipindahkan ke cawan petri steril didiamkan selama kurang lebih 30 menit, disiapkan 5 cawan petri (bagi menjadi 5 bagian: F1, F2, F3, K- dan K+), setelah itu sebanyak  $\pm$  15 ml media NA dituang ke dalam masing-masing cawan petri dan homogenkan lalu diisi 1 ml suspensi bakteri yang telah sesuai dengan standar kekeruhan *Mc. Farland* 0,5. Kemudian, kertas cakram/ *paper disc* yang telah direndam ditempelkan diatas media agar yang telah dituang bakteri *Streptococcus mutans*, lakukan pengulangan/ replikasi sebanyak 3 kali (Pardeny, Afiani & Nurfadiya, 2022 ; Novia, Yanti & Aini, 2021). Cawan petri dibungkus dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan posisi terbalik (Rosmania

& Yuniar, 2021), selanjutnya dilakukan pengukuran diameter zona hambat (mm) dari masing-masing konsentrasi sampel.

#### 7) Pengukuran zona hambat

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam inkubasi. Adanya aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram/ *paper disc* yang menandakan adanya efek hambat terhadap bakteri *Streptococcus mutans* (Handayani, Sundu & Sari, 2017), pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram diukur dengan diameter vertikal dan diameter horizontal menggunakan jangka sorong (Magvirah, Marwati & Ardhani, 2019)

### G. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan analisis univariat yang dilakukan terhadap variabel dari hasil penelitian. Analisis univariat ini hanya untuk menjelaskan dan menghasilkan data deskriptif seperti terkait organoleptik, pH, viskositas serta hasil dari diameter zona hambat terhadap bakteri *Streptococcus mutans* lalu data tersebut dianalisis statistik menggunakan SPSS (Notoatmodjo, S., 2018).