

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Persiapan Bahan Uji

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sembung (*Blumea balsamifera* L) yang diperoleh dari Pangandaran. Determinasi dilakukan di Herbarium Bandung Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Penanganan pasca panen bahan simplisia yang telah bersih dikeringkan didalam oven (40-50°C). Setelah kering simplisia digiling dengan mesin penggiling atau diblender hingga diperoleh ukuran yang lebih kecil. Simplisia daun sembung tersebut diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Simplisia daun sembung (*Blumea balsamifera* L) diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol selama 24 jam dan diulangi sebanyak 3 kali. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary vaccuum evaporator* pada suhu 50°C, hingga diperoleh ekstrak pekat, persen rendemen ekstrak dihitung dengan rumus: (Muhyini, 2004:19, Harborne, 1987 : 6-7).

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

4.2 Penetapan Kadar Air Simplisia

Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan metode azeotrop, yaitu tabung penampung dan kondensor dibersihkan dengan cara dibilas dengan air kemudian dikeringkan dalam oven. Ke dalam labu destilat dimasukkan 200 ml toluene yang telah dijenuhkan dengan 2 ml aquadest. Simplisia sebanyak 25 gram dimasukkan ke dalam labu bundar. Labu bundar dididihkan perlahan-lahan selama kurang lebih 15 menit, setelah mendidih disuling dengan kecepatan 2 tetes/detik hingga sebagian besar air tersuling kemudian kecepatan penyulingan dinaikan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam kondensor dibilas dengan toluene, selanjutnya penyulingan dilanjutkan selama 5 menit, kemudian pemanasan dihentikan. Tabung penerima didinginkan sampai suhu kamar. Tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima dihilangkan. Air dan toluene dibiarkan memisah dalam tabung penerima, kemudian volume air dalam tabung penerima diamati.

4.3 Penapisan fitokimia

4.3.1. Senyawa polifenolat

Satu spatel simplisia serbuk di tempatkan pada tabung reaksi, lalu ditambahkan air secukupnya, dan dipanaskan diatas penangas air kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida, apabila timbul warna hijau atau biru hijau, merah ungu, biru hitam

menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1996).

4.3.2. Flavonoid

Bahan digerus dalam mortir dengan sedikit air, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi logam magnesium atau seng dan larutan HCl 2 N. Seluruh campuran dipanaskan 5-10 menit. Setelah disaring panas-panas dan filtrat dibiarkan dingin, kepada filtrat ditambahkan amil alkohol, lalu dikocok kuat-kuat. Adanya warna kuning hingga merah pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Farnsworth 1996: 262-264).

4.3.3. Tanin dan polifenol

Bahan digerus dengan air hingga lumat, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dididihkan selama beberapa menit. Setelah disaring, filtrat dibagi dua bagian. Ke dalam filtrat satu diteteskan larutan pereaksi besi (III) klorida. Adanya warna biru hingga hitam menunjukkan adanya senyawa golongan tanin dan polifenol. Kedalam filtrat dua diteteskan larutan gelatin, lalu diamati terjadinya pengendapan atau penggumpalan. Adanya penggumpalan menunjukkan bahwa dalam filtrat terkandung senyawa golongan tanin. Endapan gelatin disaring. Filtrat ditetesi larutan pereaksi besi (III) klorida. Bila terbentuk warna hitam, berarti bahwa dalam bahan tersebut terkandung golongan tanin dan polifenol (Farnsworth, 1996 : 264).

4.3.4. Kuinon

Bahan digerus dengan air. Saring melalui kapas. Kepada filtrat diteteskan larutan basa kuat (NaOH atau KOH). Terjadinya warna merah menunjukkan bahwa

dalam simplisia atau bahan yang diuji terdapat senyawa golongan kuinon (Farnsworth, 1996: 265-266).

4.3.5. Monoterpen dan sesquiterpen

Tiga spatel simplisia serbuk digerus dengan eter kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat dan apabila timbul warna-warna menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Farnsworth, 1996).

4.3.6. Triterpenoid dan steroid

Tiga spatel simplisia serbuk digerus dengan eter kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ditambahkan larutan pereaksi Libermann Burchard dan apabila timbul warna merah ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila timbul warna hijau biru menandakan positif steroid (Farnsworth, 1996 : 266-267).

4.3.7. Saponin

Bahan digerus dengan air hingga lumat, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan lagi sedikit air dan dipanaskan. Setelah dingin, tabung dikocok kuat-kuat selama beberapa menit. Pembentukan buih atau busa diamati. Bila terjadi pembentukan buih atau busa setinggi minimal 1 cm dan bertahan selama 5-10 menit serta tidak menghilang dengan penambahan 1 tetes HCL 0,1 N, berarti bahwa bahan yang diuji mengandung saponin (Farnsworth, 1996 : 257-260).

4.3.8. Alkaloid

Bahan ditempatkan pada mortir, dibasakan dengan ammonia, kemudian ditambahkan kloroform, lalu digerus kuat. Cairan (kloroform) dipipet melalui kapas. Filtrat ditempatkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan HCl 1 N, campuran dikocok, lalu dibiarkan hingga terjadi pemisahan fase. Fase air diambil, dibagi tiga bagian, masing-masing ditempatkan dalam tabung reaksi terpisah. Kedalam filtrat satu ditetaskan larutan pereaksi Dragendorf. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan atau kekeruhan berwarna jingga coklat. Ke dalam filtrat dua ditetaskan larutan pereaksi Mayer. Adanya endapan atau kekeruhan berwarna putih menunjukkan adanya senyawa kimia golongan alkaloid. Filtrat tiga digunakan sebagai blanko atau kontrol negatif (Farnsworth, 1996: 245-257).

4.4. Penyiapan Uji

4.4.1 Sterilisasi Alat Bahan

Semua alat yang digunakan tabung reaksi, cawan petri dan erlemeyer di sterilisasi untuk menghindari kontaminasi. Alat dibungkus dengan kertas sampai rapat. Alat-alat dengan mulut terbuka seperti tabung reaksi dan erlemeyer bagian mulutnya disumbat dengan kapas berlemak, ditutup kain kasa lalu dibungkus dengan aluminium foil dan diikat rapat dengan benang kasar. Setelah itu baru dibungkus dengan kertas. Masukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4.4.2 Penyiapan media TSA (*Tryptone Soya Agar*)

Media TSA dibuat dengan cara melarutkan TSA didalam aquadest dan dipanaskan hingga larutan menjadi bening. Larutan tersebut dimasukan ke dalam erlenmeyer, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Agar dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan dingin hingga memadat.

4.4.3 Pembuatan dan Sterilisasi Media

Media TSA dibuat dengan cara melarutkan 40 gram media dalam 1000 ml aquadest. Media Natrium Agar dibuat dengan cara melarutkan 40 gram media dalam 1000 ml aquadest. Media Natrium Broth dibuat dengan cara melarutkan 30 gram media dalam 1000 ml aquadest. Tempatkan di dalam erlemeyer, panaskan dengan hot plate stirrer hingga bening dan mendidih sampai media larut dengan sempurna. Erlenmeyer disumbat dengan kapas berlemak, ditutup kain kasa lalu dibungkus dengan alumunium foil dan diikat rapat dengan benang kasur. Kemudian dilakukan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4.4.4 Penyiapan biakan bakteri *Propionibacterium acnes*

Bakteri *Propionibacterium acnes* yang digunakan harus diremajakan terlebih dahulu dengan cara digoreskan pada agar miring *tryptone soya agar* (TSA) dan *nutrient agar* (NA) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Bakteri tersebut diambil satu ose dan disuspensikan ke dalam *tryptone soya broth* (TSB) dan *nutrient broth* (NB) yang sudah disterilkan. Kemudian diukur pada spektrofotometer pada $\lambda = 530 \text{ nm}$ sehingga didapat persen transmittan (% T = 25%).

4.4.5 Pengujian Aktivitas Antijerawat Ekstrak Etanol Daun Sembung

Peralatan dan bahan yang digunakan dalam pengujian harus disterilisasi terlebih dahulu kemudian dilakukan pengujian aktivitas antijerawat dari ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera L.*) terhadap *Propionibacterium acnes* dilakukan dengan metode difusi agar dengan menggunakan perforator (sumur). Dalam cawan petri dimasukan 50 µl suspensi bakteri yang telah diukur transmittannya. Sebanyak 20 mL *trythone soya agar* (TSA) steril dituangkan ke dalam cawan petri steril yang telah ditandai menjadi 4 bagian. Cawan petri digerakan perlahan-lahan agar suspensi bakteri tersebar merata dan homogen, didiamkan beberapa menit hingga memadat. Setelah agar memadat, dibuat lubang pada agar tersebut dengan menggunakan perforator berdiameter 0.6 cm pada jarak tertentu.

Pada masing-masing lubang dimasukan ekstrak etanol daun sembung (*Blumea balsamifera L.*) serta untuk kontrol digunakan DMSO dan pembanding antibiotik klindamisin pada setiap bakteri uji. Sediaan uji yang digunakan memiliki kosentrasi yang bertingkat 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% dan 75% (triplo). Masing-masing lubang dalam cawan petri diisi sediaan uji, DMSO dan antibiotik (klindamisin) sebanyak 50µl kemudian dilakukan pra-inkubasi selama ±30-60 menit lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Aktivitas antijerawat diamati berdasarkan pengukuran diameter zona hambat atau zona hambat yang terbentuk di sekeliling sumur diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong. Pengujian dilakukan secara triplo atau 3 kali pengulangan (Anggriani, 2014).

4.4.6 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penetapan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol daun sembung (*Blumea balsamifera* L) dengan metode difusi agar dengan konsentrasi yang bertingkat yaitu 1%, 2%, 3%, dan 4%.

4.4.7 Pembuatan Dosis Antibiotik Pembanding

Orientasi dosis pembanding klindamisin dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi dari pembanding yang dapat menyebabkan kematian bakteri dengan cara membuat pengenceran antibiotik (klindamisin). Serbuk klindamisin dengan kekuatan sediaan 300 mg kemudian dilarutkan dalam dalam aquades steril. Larutan stok sebanyak 3000 ppm, kemudian dilakukan pengenceran dengan konsentrasi bertingkat yaitu: 31.25 ppm, 62.5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, dan 500 ppm.

4.5 Penetapan Kesetaraan Aktivitas Antibakteri Uji Dengan Antibiotik Pembanding

Kesetaraan antibiotik diperoleh dengan membandingkan respon berupa hambatan pertumbuhan bakteri sampel terhadap respon dari zat pembanding pada perlakuan yang sama. Dari kurva baku kloramfenikol diperoleh persamaan garis linear, kemudian nilai diameter daerah hambat ekstrak pada konsentrasi tertentu disubstitusikan ke y sehingga nilai x dapat diketahui. Antilog nilai x merupakan konsentrasi yang setara dengan antibiotik (Respati, 2010).