

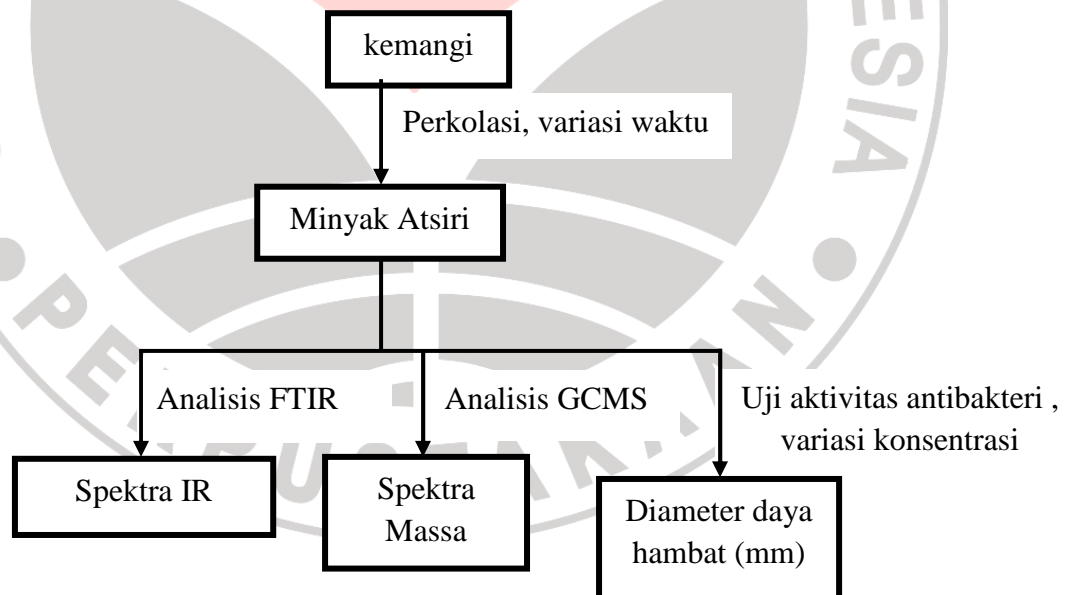
BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Deskripsi Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap yaitu tahap pertama adalah perkolasi kemangi kering menggunakan pelarut air dengan variasi waktu perkolasi. Tahap kedua adalah analisis spektrum GC-MS, FTIR dan uji antibakteri minyak atsiri kemangi terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* dan *Salmonella enteritidis* dengan variasi konsentrasi.

Tahap penelitian di atas sesuai dengan bagan alir yang ditunjukkan pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Desain Penelitian Isolasi Minyak Atsiri Kemangi dan Analisis Hasil Isolasi

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan adalah satu set perkolator, FTIR (Fourier Transform Infrared) Shimadzu 8400, spektrometer GCMS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometer*) Shimadzu QP5050A, waterbath shaker, inkubator, mikropipet, dan seperangkat alat gelas lainnya.

3.2.2 Bahan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan kemangi yang diperoleh dari pasar Ciroyom, bakteri *E.coli* dari Lab. Mikrobiologi FPMIPA UPI, bakteri *Shigella sonnei* dan *Salmonella enteritidis* dari Lab. Kesehatan Depkes RI. Bahan-bahan yang digunakan air, Na₂SO₄ anhidrat, medium nutrisi broth, medium KNA, medium SSA, etanol p.a, Tetrasiklin dan *Thiamphenicol*.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Preparasi Kemangi

Kemangi yang digunakan pada penelitian ini merupakan kemangi yang masih muda. Kemangi yang masih basah ditimbang. Selanjutnya kemangi dikeringkan tanpa terkena matahari langsung ± 2 minggu. Setelah cukup kering, lalu ditimbang.

3.3.2 Isolasi Minyak Atsiri Kemangi

3.3.2.1 Variasi Waktu

3.3.2.1.1 Daun Kemangi

Daun kemangi kering dimasukan kedalam labu dasar bulat 3000 mL, ditambahkan air, kemudian diperkolasi dengan beberapa variasi waktu, yaitu selama 1 jam, 2 jam dan 3 jam. Suhu dijaga sekitar 120-130 °C. Hal ini dilakukan untuk mengetahui randemen minyak atsiri kemangi yang dihasilkan. Set alat perkolasi ditunjukkan pada Gambar 3.2



Gambar 3.2 Set Alat Perkolasi

3.3.2.1.2 Batang Kemangi

Batang kemangi kering dimasukkan kedalam labu dasar bulat 3000 mL, tambahkan air, kemudian diperkolasi dengan beberapa variasi waktu, yaitu selama 1 jam, 2 jam dan 3 jam. Suhu dijaga sekitar 120-130 °C. Hal ini dilakukan untuk mengetahui randemen minyak atsiri kemangi yang dihasilkan.

3.3.2.2 Pemisahan Hasil Perkolasi

Minyak atsiri daun dan batang kemangi hasil perkolasi ditampung dalam botol, dimasukkan Na_2SO_4 anhidrat. Kemudian minyak atsiri kemangi didekantasi kedalam botol coklat. Botol disimpan dalam lemari yang tidak terkena cahaya.

3.3.3 Analisis Kandungan Senyawa

Analisis dilakukan dengan FTIR dan GCMS. Dari analisis ini diperoleh spektrum berupa puncak bilangan gelombang (cm^{-1}) dan massa senyawa yang terdapat pada minyak kemangi hasil perkolasi. Adapun kondisi yang digunakan pada saat analisis GCMS yaitu sebagai berikut:

Metode : Terprogram

Detektor : DB 5 MS

Suhu kolom : 60°C

Suhu detektor : 300°C

Waktu analisa : 29 menit

Volume injeksi: 0,2 μL

3.3.4 Uji Aktivitas Antibakteri

3.3.4.1 Sterilisasi

Proses sterilisasi alat dan bahan dibagi menjadi dua cara. Seluruh alat gelas tahan panas, bahan dan media yang tidak akan rusak apabila terkena panas disterilkan dengan menggunakan autoklaf. Sterilisasi dengan menggunakan autoklaf menggunakan uap air bertekanan tinggi pada suhu 121°C selama 15 menit. Untuk alat yang tidak tahan panas, disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%.

3.3.4.2 Aktivasi Bakteri

Untuk melakukan pengujian terhadap bakteri, diperlukan aktivasi bakteri terlebih dahulu. Hal ini dilakukan agar bakteri yang akan diuji menjadi aktif dan bekerja secara optimal. Aktivasi dilakukan secara bertahap untuk setiap bakteri. Mula-mula isolat bakteri hasil subkultur diambil sebanyak 1 ose dan dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 10 mL medium cair untuk kemudian diinkubasi dalam waterbath shaker selama 24 jam pada 120 rpm dengan suhu inkubasi 37°C.

3.3.4.3 Preparasi Minyak Atsiri Kemangi

Minyak atsiri hasil perkolasi dibuat dengan berbagai konsentrasi (v/v) 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% dengan menggunakan pelarut etanol p.a dimasukkan dalam botol coklat. Kemudian dihomogenkan dengan homogenizer. Lalu masukan kertas cakram pada masing-masing botol.

3.3.4.4 Pengujian Minyak Atsiri Kemangi Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Dengan Metode Difusi Agar

Uji antibakteri minyak atsiri kemangi dengan metode difusi agar dilakukan pada *E.coli* yang telah diaktivasi. Cawan petri yang telah disterilisasi dan ditandai untuk 3 jenis konsentrasi, diisi dengan 1 mL inokulum kemudian masukan 9 mL medium KNA lalu homogenkan hingga merata dengan cara diputar diatas meja dan biarkan hingga memadat. Selanjutnya simpan masing-masing cakram kertas yang telah direndam dalam larutan minyak atsiri dengan konsentrasi 0% (kontrol negatif), 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% pada cawan petri sesuai dengan tanda konsentrasi dilakukan sebanyak 5 kali replikasi. Sebagai kontrol positif digunakan tetrasiklin 500 mg dan *thiamphenicol* 500 mg masing-masing dilarutkan dalam 10 mL aquades. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona bening disekitar cakram kertas diamati dan diukur dengan menggunakan jangka sorong.

3.3.4.5 Pengujian Minyak Atsiri Kemangi Terhadap Bakteri *Shigella sonnei* Dengan Metode Difusi Agar

Uji antibakteri minyak atsiri kemangi dengan metode difusi agar dilakukan pada *Shigella sonnei* yang telah diaktivasi. Cawan petri yang telah disterilisasi dan ditandai untuk 3 jenis konsentrasi, diisi dengan 1 mL inokulum kemudian masukan 9 mL medium SSA lalu homogenkan hingga merata dengan cara diputar diatas meja dan biarkan hingga memadat. Selanjutnya simpan masing-masing cakram kertas yang telah direndam dalam larutan minyak atsiri dengan konsentrasi 0% (kontrol negatif), 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% pada cawan petri

sesuai dengan tanda konsentrasi. Sebagai kontrol positif digunakan tetrasiklin 500 mg dan *thiamphenicol* 500 mg masing-masing dilarutkan dalam 10 mL aquades. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona bening disekitar cakram kertas diamati dan diukur dengan menggunakan jangka sorong.

3.3.4.6 Pengujian Minyak Atsiri Kemangi Terhadap Bakteri *Salmonella enteritidis* Dengan Metode Difusi Agar

Uji antibakteri minyak atsiri kemangi dengan metode difusi agar dilakukan pada *Salmonella enteritidis* yang telah diaktivasi. Cawan petri yang telah disterilisasi dan ditandai untuk 3 jenis konsentrasi, diisi dengan 1 mL inokulum kemudian masukan 9 mL medium SSA lalu homogenkan hingga merata dengan cara diputar diatas meja dan biarkan hingga memadat. Selanjutnya simpan masing-masing cakram kertas yang telah direndam dalam larutan minyak atsiri dengan konsentrasi 0% (kontrol negatif), 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% pada cawan petri sesuai dengan tanda konsentrasi. Sebagai kontrol positif digunakan tetrasiklin 500 mg dan *thiamphenicol* 500 mg masing-masing dilarutkan dalam 10 mL aquades. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona bening disekitar cakram kertas diamati dan diukur dengan menggunakan jangka sorong.

3.3.4.7 Penentuan Hasil

Untuk pengujian dengan menggunakan metode difusi agar, hasil penelitian ditentukan berdasarkan zona hambat yang dihasilkan dengan cara mengukur diameter area bening disekitar kertas cakram dalam satuan milimeter (mm).

Kemudian data yang dihasilkan dianalisis. Kriteria zona hambat bakteri oleh ekstrak diklasifikasikan menjadi: tidak efektif (-) diameter < 8 mm, efektif (+) diameter $\geq 9-14$ mm, sangat efektif (++) diameter 15-19 mm, dan sangat efektif sekali (+++) diameter ≥ 20 mm (Moreira *et al*, 2003).

