BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Juli 2019 di Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Instrumen Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahu Alam Universitas Pendidikan Indonesia (UPI). Untuk uji determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Identifikasi dan Determinasi Sekolah Ilmu dan Tumbuhan Hayati Institut Teknologi Bandung (ITB) dan untuk uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Lingkungan Jurusan Biologi FPMIPA UPI.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

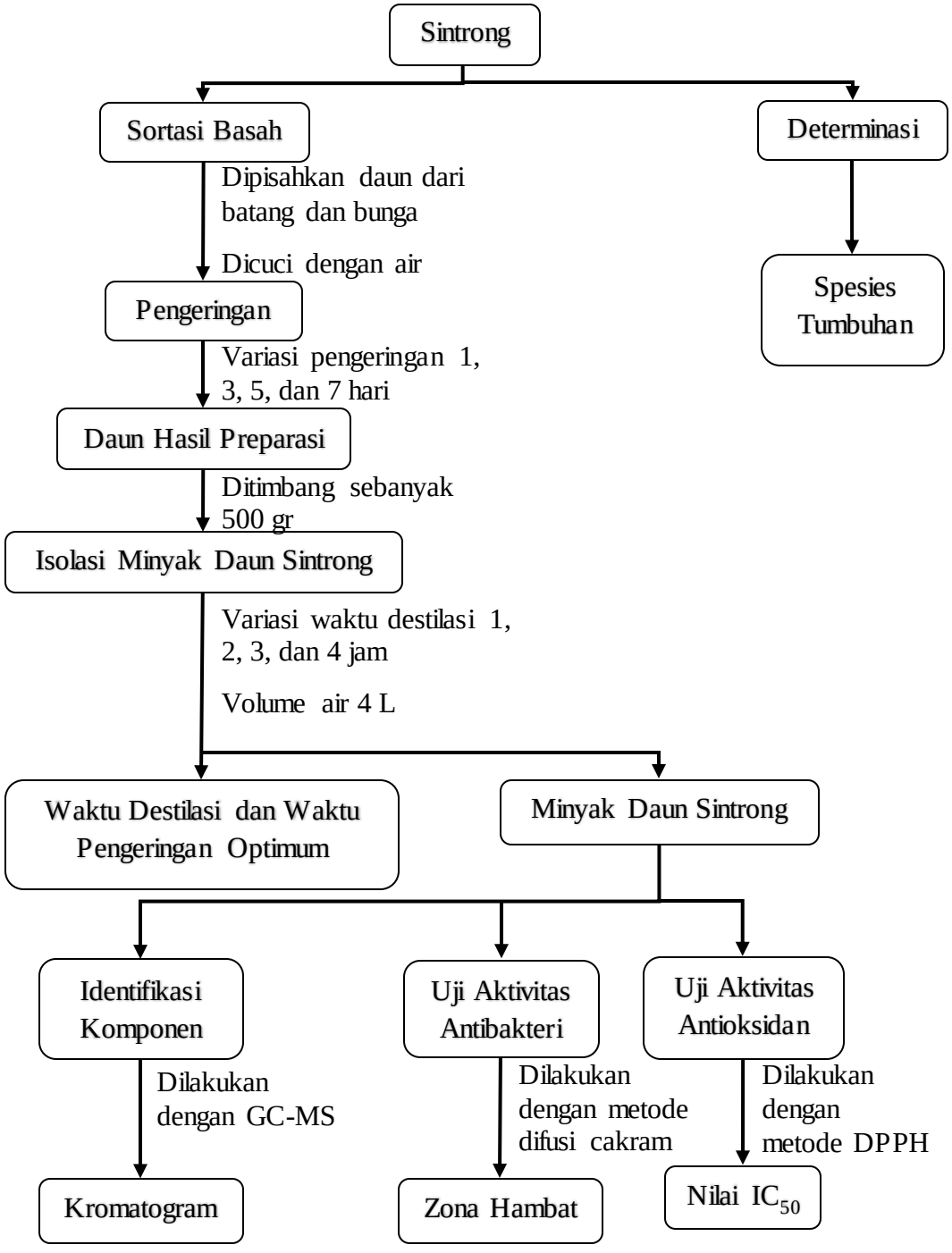
Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi set alat destilasi uap perkolasi yang terdiri dari tabung destilasi, alat gelas *clavenger*, kondensor *Liebieg*, selang, pompa, kompor gas, tabung gas, statif dan klem. Adapun alat-alat lain yang digunakan yaitu, GC-MS, spektrofotometer UV-Vis, peralatan gelas, pipet, *hotplate*, *shaker*, *waterbath shaker*, *alumunium foil*, termometer, autoklaf, statif, klem, loop inokulasi, jangka sorong, penangas air, cawan petri, kaca arloji dan botol vial.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu natrium sulfat (Na_2SO_4) anhidrat, padatan DPPH, asam askorbat, ampisilin, media tumbuh *Nutrient Broth* (NB), media tumbuh *Nutrient Agar* (NA), kultur bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, metanol, etanol 96% dan aquades. Adapun sampel yang berupa tumbuhan sintrong diperoleh dari perkebunan Pusat Pelatihan Pertanian dan Pedesaan Swadaya (P4S) Tani Mandiri di daerah Cibodas Lembang.

3.3 Alur Penelitian

Tahapan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.4 Tahapan Penelitian

3.4.1 Determinasi Sampel

Determinasi sampel dilakukan dengan cara mengidentifikasi struktur tumbuhan sintrong dengan menggunakan kunci determinasi. Determinasi sampel sintrong dilakukan di Laboratorium Identifikasi dan Determinasi SITH ITB.

3.4.2 Preparasi Sampel Daun Sintrong

Preparasi sampel daun sintrong dilakukan dengan cara sortasi basah terlebih dahulu untuk memisahkan daun dari batang dan bunga, kemudian dilakukan pencucian menggunakan air, lalu dikeringkan di udara terbuka.

3.4.3 Optimasi Waktu Destilasi Uap Perkolasi dan Pengeringan Daun pada Isolasi Minyak Atsiri Daun Sintrong

a. Optimasi Variabel Waktu Destilasi Uap Perkolasi

Optimasi waktu destilasi ini dilakukan untuk mengetahui waktu penyulingan yang optimum dalam isolasi minyak atsiri daun sintrong. Tahapan pertama yang dilakukan adalah memasang set alat destilasi uap perkolasi dan memastikannya terpasang dengan rapat. Kemudian sebanyak 500 gram sampel daun sintrong kering dimasukkan ke dalam wadah destilasi dan ditutup kembali hingga rapat. Setelah itu, dilakukan pemanasan dengan menggunakan kompor.

Proses optimasi waktu penyulingan ini dilakukan dengan 4 variabel waktu yaitu, 1, 2, 3, dan 4 jam selang waktu pengamatan 30 menit. Kemudian masing-masing destilat yang diperoleh diidentifikasi dengan instrumen GC-MS.

b. Optimasi Variabel Waktu Pengeringan Daun

Optimasi waktu pengeringan daun dilakukan untuk mengetahui waktu pengeringan daun yang optimum dalam isolasi minyak atsiri daun sintrong. Tahapan pertama yang dilakukan adalah memasang set alat untuk destilasi uap perkolasi dan memastikannya terpasang dengan rapat. Kemudian sebanyak 500 gram sampel daun sintrong dengan waktu pengeringan 1, 3, 5, dan 7 hari dimasukkan ke dalam wadah destilasi dan ditutup kembali hingga rapat. Setelah itu, dilakukan pemanasan dengan kompor. Waktu penyulingan dilakukan pada waktu destilasi optimum berdasarkan hasil dari optimasi waktu destilasi.

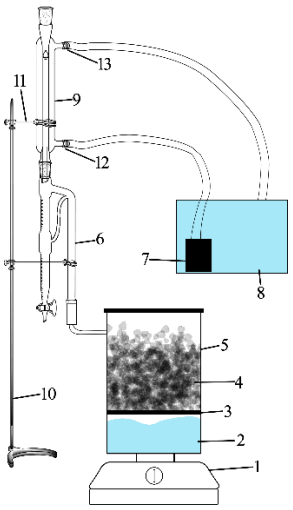
Masing-masing destilat kemudian dilakukan identifikasi komponen dengan instrumen GC-MS.

c. Isolasi Minyak Atsiri Daun Sintrong pada Waktu Destilasi Uap Perkolasi dan Pengeringan Daun yang Optimum

Isolasi minyak atsiri daun sintrong pada kondisi optimum dilakukan agar didapat rendemen minyak atsiri yang paling tinggi. Tahap awal isolasi ini dilakukan dengan memasang set alat destilasi uap perkolasi terlebih dahulu dan memastikannya terpasang dengan rapat. Kemudian sebanyak 500 gram sampel sampel dengan waktu pengeringan daun yang optimum dimasukkan ke dalam wadah destilasi uap dan ditutup kembali hingga rapat. Setelah itu, dilakukan pemanasan dengan kompor. Proses destilasi uap ini dilakukan dengan waktu penyulingan yang optimum.

Proses destilasi uap ini dilakukan hingga akhir waktu penyulingan optimum dan diperoleh minyak atsiri daun sintrong. Kemudian destilat yang didapat diidentifikasi dengan instrumen GC-MS.

Adapun set alat destilasi uap perkolasi yang digunakan pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 3.2.



Keterangan:
1. Kompor gas
2. Pelarut air
3. Sekat pemisah
4. Tempat sampel
5. Wadah destilasi
6. Alat *Clevenger*
7. Pompa air
8. Penampung air
9. Kondensor *Liebig*
10. Statif
11. Klem
12. Selang air masuk
13. Selang air keluar

Gambar 3.2 Set Alat Destilasi Uap Perkolasi

3.4.4 Identifikasi Komponen Minyak Atsiri Daun Sintrong

Identifikasi komponen dari minyak atsiri daun sintrong dilakukan dengan instrumen GC-MS dengan kondisi instrumen sebagai berikut:

a. Kondisi kromatografi gas

Kolom : Rtx-5

Temperatur Injektor : 280^{o}C

Mode Injeksi : Split

Fasa gerak : Helium dengan laju konstan 1,0mL/menit dan dengan kecepatan rata-rata 41,7 cm/detik

Tekanan : 80,2 kPa

Temperatur Kolom : Awal : 60^{o}C (didiamkan selama 5 menit)

Akhir : 270^{o}C

Laju naik temperatur : 8^{o}C/2 menit

b. Kondisi spektroskopi massa

Temperatur Sumber Ion : 230^{o}C

Temperatur Oven : 250^{o}C

3.4.5 Uji Aktivitas Antioksidan Minyak Atsiri Daun Sintrong

Pengujian aktivitas antioksidan dari minyak atsiri daun sintrong ini dilakukan dengan metode DPPH menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis dengan kontrol positif asam askorbat.

a. Pembuatan Larutan DPPH

Ditimbang sebanyak 2 mg DPPH dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Kemudian ditambahkan 25 mL metanol, dihomogenkan. Lalu ditambahkan metanol kembali hingga tanda batas. Didapat larutan DPPH 40 ppm dalam metanol.

b. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko dibuat dengan menggunakan pelarut metanol sebanyak 3 mL.

c. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Larutan kontrol positif dibuat dengan menimbang sebanyak 1 mg padatan asam askorbat. Kemudian ditambahkan 25 mL metanol, dihomogenkan. Dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan metanol kembali hingga tanda batas. Didapat larutan asam askorbat 20 ppm, larutan ini kemudian dibuat variasi konsetrasi 1, 3, 5, 7 dan 9 ppm dengan pengenceran.

d. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Pembuatan larutan kontrol negatif dilakukan dengan memipet sebanyak 2 mL larutan DPPH 40 ppm ke dalam 4 mL metanol.

e. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dengan cara membuat larutan induk terlebih dahulu. Larutan induk dibuat dengan menimbang minyak atsiri daun sintrong sebanyak 500 mg yang kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL. Kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas. Setelah didapat larutan induk, dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 2500, 5000, 10000, 15000 dan 20000 ppm.

f. Pengukuran Larutan Blanko

Larutan blanko dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelobang (λ) 517 nm. Dilihat serapan maksimumnya.

g. Pengukuran Larutan Kontrol Positif

Pengukuran larutan kontrol positif dilakukan dengan mencampurkan 4 mL larutan kontrol positif pada masing-masing konsetrasi dengan 2 mL larutan DPPH 40 ppm. Kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit hingga terjadi perubahan warna, kamudian diukur serapannya.

h. Pengukuran Larutan Kontrol Negatif

Larutan kontrol negative dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian diukur serapannya. Dilihat serapannya.

i. Pengukuran Larutan Uji

Pengukuran larutan uji dilakukan dengan mencampurkan 4 mL larutan uji pada masing-masing konsetrasi dengan 2 mL larutan DPPH 40 ppm. Kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit hingga terjadi perubahan warna, kamudian diukur serapannya.

j. Penentuan Nilai %Inhibisi

Penentuan nilai %inhibisi dilakukan dengan menghitung nilai %inhibisi dari berbagai konsentrasi larutan uji dan larutan kontrol positif. Penentuan nilai %inhibisi dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$\%inhibisi = \left(\frac{A_{kontrol\ negatif} - A_{uji}}{A_{kontrol\ negatif}}\right) \times 100$$

Dari hasil ini akan didapat nilai %inhibisi dari masing-masing konsentrasi larutan uji dan larutan kontrol positif.

k. Penentuan Nilai IC_{50}

Penentuan nilai IC_{50} dilakukan dengan memplot nilai %inhibisi terhadap konsentrasi larutan. Setelah itu akan didapat persamaan regresi linier yang kemudian dapat ditentukan nilai IC_{50}, dimana nilai dari y sebesar 50 dan nilai x yang didapat merupakan nilai dari IC_{50}.

3.4.6 Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Sintrong

Pengujian aktivitas antibakteri dari minyak atsiri daun sintrong dilakukan dengan metode difusi cakram (*Kirby* dan *Bauer*) dan menggunakan ampisilin sebagai kontrol positif.

a. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat bertujuan agar alat-alat yang digunakan untuk uji dalam kondisi steril. Langkah ini dilakukan dengan melakukan proses sterilisasi terhadap alat-alat dan media tumbuh yang dipakai menggunakan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

b. Pembuatan Kultur Bakteri

1) Membuat sub kultur bakteri

   Pembuatan sub kultur bakteri dilakukan dengan mengembangbiakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada media *Nutrient Agar* (NA) miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

2) Membuat kultur cair bakteri

   Pembuatan kultur cair dilakukan dengan cara mengambil bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan loop inokulasi atau jarum inokulum ke dalam media *Nutrien Broth* (NB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam menggunakan *waterbath shaker* pada 110 rpm.

   Kemudian setelah didapat kultur bakteri, dilakukan pengaturan konsentrasi bakteri menjadi 1 x 10^5 CFU/ml dan disimpan pada lemari pendingin selama 4 jam. Kultur bakteri siap digunakan.

c. Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji sampel minyak atsiri daun sintrong dilakukan dengan cara membuat sampel menjadi beberapa konsentrasi, yaitu konsentrasi 10, 20, 40, 60, 80, dan 100%.

d. Pengukuran Larutan Uji

Pengukuran larutan uji dilakukan dengan memasukkan biakan bakteri uji sebanyak 1 mL ke dalam cawan petril streril yang telah dibagi menjadi 6 kuadran pada bagian luarnya. Kemudian dituangkan agar diri NA cair yang telah dipanaskan dengan penangas air ke dalam cawan petri. Setelah itu dihomogenkan dengan cara memutar cawan di atas meja searah jarum jam dan sebaliknya hingga bakteri uji dipastikan tercampur merata. Kemudian didiamkan hingga memadat. Setelah media memadat, pada masing-masing kuadran diletakkan cakram uji berisi larutan uji dengan berbagai konsentrasi sebanyak 5µL. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37^{o}C selama 20-24 jam. Kemudian dilakukan pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong yang dinyatakan dalam sentimeter (cm).

e. Pengukuran Larutan Kontrol

Pengukuran larutan kontrol dilakukan dengan memasukkan biakan bakteri uji sebanyak satu mL ke dalam cawan petril streril yang telah dibagi menjadi 4 kuadran pada bagian luarnya. dua kuadran untuk kontrol positif (ampisilin) dan dua kuadran untuk kontrol negatif (etanol 96%). Kemudian dituangkan agar dari NA cair yang telah dipanaskan dengan penangas air ke dalam cawan petri. Setelah itu dihomogenkan dengan cara memutar cawan di atas meja searah jarum jam dan sebaliknya hingga bakteri uji dipastikan tercampur merata. Kemudian didiamkan hingga memadat. Setelah media memadat, diletakkan cakram uji berisi larutan kontrol positif pada dua kuadran dan cakram uji berisi larutan kontrol negatif pada 2 kuadram lain masing-masing sebanyak 5 µL. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37^{o}C selama 20-24 jam. Kemudian dilakukan pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong yang dinyatakan dalam sentimeter (cm).