

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman beluntas yang diperoleh dari daerah Kediri, Jawa Timur. Sampel dalam penelitian ini adalah daun segar yang berwarna hijau tidak terlalu tua yang masih segar. Daun beluntas diambil secara acak dari daerah Kediri, Jawa Timur bulan Februari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dari penelitian ini adalah uji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun beluntas terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang biasa diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi dari minyak atsiri daun beluntas.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri minyak atsiri daun beluntas terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 pada media selektif.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175,

kondisi laboratorium (meliputi kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, waktu panen, pemilihan daun, metode isolasi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun beluntas adalah daun dari tanaman beluntas yang masih segar, sehat dan terbebas dari hama dan penyakit yang diambil di daerah Kediri, Jawa Timur yang diambil pada bulan Februari 2019.

Kedua, daun beluntas yang sudah dipetik kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, setelah itu daun yang sudah dicuci bersih, kemudian dirajang kecil-kecil

Ketiga, minyak atsiri daun beluntas adalah minyak atsiri hasil isolasi dari daun beluntas segar menggunakan metode destilasi uap-air.

Keempat, pembuatan konsentrasi minyak atsiri daun beluntas dengan konsentrasi 12,5%; 25%; 50%.

Kelima, bakteri uji dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keenam, metode difusi dengan menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji dari minyak atsiri yaitu dengan menggunakan cakram. Kontrol negatif tween dan kontrol positif adalah kloramfenikol.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah destilasi uap-air, erlenmeyer, GC-MS Shimadzu GCMS-QP2010S, KLT, chamber, jarum ose, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, cawan petri steril, kapas lidi steril, *obyek glass*, inkubator, kertas cakram ukuran 6 mm, mikropipet, autovortex mixer, gelas ukur, pipet volume, botol vial, autoklaf, oven, pinset, neraca analitik, spidol dan penggaris.

2. Bahan

2.1 Bahan utama. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun beluntas.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, etanol, n-heksan, kloroform, benzene, larutan iodium, tween, kloramfenikol.

2.3 Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2.4 Medium. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mueller Hilton Agar* (MHA), *Brain Herat Infusion* (BHI), *Blood Agar Plate* (BAP), *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Kigler Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Citrat*.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi dilakukan untuk mengetahui daun yang digunakan benar-benar daun beluntas dan identitas daun beluntas yang akan digunakan sebagai bahan uji dalam penelitian. Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman beluntas sesuai kepustakaan dan dibuktikan dibagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Daun beluntas diambil di daerah Kediri, Jawa Timur. Sampel yang digunakan adalah daun yang tidak terlalu tua dan masih segar dan bebas dari hama yang akan diisolasi dengan destilasi.

3. Isolasi minyak atsiri

Minyak atsiri diisolasi dengan menggunakan metode destilasi uap-air. Daun beluntas yang masih segar masing-masing dipotong kecil-kecil dan dimasukkan ke dalam alat destilasi yaitu dandang dengan penyangga berlubang yang telah berisi air. Penyulingan dilakukan di atas api sampai air mendidih. Uap air yang dihasilkan

dialirkan pada pipa bagian kondensor dan mengalami kondensasi, bersama dengan uap air tersebut terbawa dengan minyak atsiri. Destilasi akan dihentikan apabila jumlah volume minyak atsiri yang keluar tidak bertambah, kemudian destilat ditampung dan diukur jumlah volume yang dihasilkan.

Minyak yang diperoleh kemudian dilakukan pemisahan fase air dan minyak dengan ditambahkan natrium sulfat anhidrat untuk memisahkan antara minyak dan air. Minyak yang diperoleh kemudian disimpan dalam wadah gelap dan di tempat yang sejuk, hal ini dilakukan untuk menghindari minyak atsiri yang didapat agar tidak rusak atau teroksidasi

4. Analisis minyak atsiri

4.1 Pengamatan organoleptis. Pengamatan organoleptik terhadap minyak atsiri meliputi warna, aroma, bentuk dan rasa dari minyak. Warna minyak atsiri hasil destilasi masing-masing sampel diambil volume sama dan ditempatkan dalam sebuah tempat kaca yang bersih dan jernih. Bau dan rasa minyak atsiri memiliki bau dan rasa yang khas sesuai dari tanaman asalnya. Organoleptik minyak atsiri daun beluntas memiliki bau aromatik yang khas.

4.2 Identifikasi minyak atsiri. Identifikasi minyak atsiri daun beluntas seperti identifikasi minyak atsiri pada umumnya yaitu minyak atsiri daun beluntas ditetaskan pada permukaan air, minyak atsiri akan menyebar dan permukaan tidak akan keruh. Minyak atsiri ditetesi pada kertas saring, jika dibiarkan minyak akan menguap sempurna tanpa meninggalkan noda lemak (Gunawan dan Mulyani 2004).

4.3 Penetapan indeks bias minyak atsiri. Penetapan indeks bias ditetapkan dengan alat refraktometer dan diulang sebanyak tiga kali. Badan prisma dibuka kemudian dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi alkohol. Refraktometer diatur sehingga garis dan skala tampak jelas, mencatat suhu ruang tempat bekerja kemudian meneteskan cairan yang diukur pada prisma dan menutup kembali. Pemutar sebelah kanan diatur sehingga batas gelap dan terang pada garis, dibaca skala catat indeks biasnya.

4.4 Uji kelarutan dalam etanol. Sebanyak 1 ml contoh uji dipipet ke dalam gelas ukur 10 ml, ditambahkan etanol dengan cara bertahap. Pada setiap penambahan alkohol dikocok dan diamati kejernihannya (SNI 2001).

4.5 Uji kromatografi lapis tipis. Hasil isolasi berupa minyak atsiri daun beluntas ditotolkan pada lempeng silika gel GF₂₅₄ dengan menggunakan pipa kapiler sehingga membentuk totolan. Lempeng tersebut dimasukkan ke dalam chamber yang telah dijenuhkan. Fase gerak yang digunakan adalah N heksana : kloroform (99:1) (Prihartini *et al.* 2015). Setelah fase gerak naik sampai tanda batas atas, lempeng dikeluarkan dari chamber dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Deteksi noda dilakukam di bawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm, selanjutnya disemprot dengan pereaksi vanilin-asam sulfat agar nodanya tampak jelas kemudian dipanaskan di bawah oven 105°C selama 5 menit. warna yang timbul diamati, kemudian dihitung harga hRf bercak dengan rumus :

$$hRf = \frac{\text{Jarak bercak}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh fase gerak}} \times 100$$

4.6 Uji kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS). Pengujian komponen senyawa penyusun minyak atsiri daun beluntas menggunakan GC-MS Shimadzu GCMS-QP2010S (Shimadzu Corporation, Kyoto, japan) dilengkapi dengan Capillary Column DB-5 5% *Phenyl Methyl Siloxane* (diameter dalam 250 μ m, panjang 60 m, dan ketebalan film 0.25 μ m) dan detektor yang digunakan FID. Kondisi GC: suhu pada oven 80°C, suhu pada injector 200°C, suhu pada detector 230°C. Gas pembawa helium dengan kecepatan aliran 1 ml/menit. Waktu retensi 40 menit, dan mass range 40-400m/z (Pitpiangchan 2009).

5. Sterilisasi alat

Seluruh alat yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan disterilkan terlebih dahulu. Alat seperti tabung reaksi, gelas ukur, dan erlenmeyer ditutup dengan kapas. Cawan Petri dibungkus dengan kertas perkamen semuanya dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Jarum Ose disterilkan dengan nyala api bunsen. Seluruh media pembenihan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

6. Pembuatan suspensi bakteri uji.

Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari biakan murni diambil sekitar 2 ose dan ditanam dalam tabung yang berisi medium *Brain Heart Infusion* (BHI) yang dikeruhkan dan disesuaikan dengan kekeruhan 0,5 McFarland yang dianggap setara $1,5 \times 10^8$ CFU/ml bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Pembuatan suspensi dilakukan dengan cara diambil koloni yang tumbuh pada media agar darah kurang lebih 2-3 jarum Ose bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan dapar fosfat 10 ml lalu homogenkan dan lakukan inkubasi selama 5-8 jam. Amati kekeruhan dan bandingkan dengan standar Mc Farland 0,5. Jika hasilnya lebih keruh dari standar Mc Farland 0,5 maka tambahkan pelarut dapar fosfat secukupnya hingga sama dengan standar, namun apabila lebih jernih dari standar maka lakukan inkubasi lagi 1-3 jam untuk mengamati apakah kekeruhannya bertambah, atau dengan cara lain dengan menambahkan mikroba bakteri beberapa Ose dari koloni bakteri pada media selektif dan inkubasi selama 1-3 jam. Amati kekeruhan hingga mencapai standar Mc Farland 0,5. Bakteri yang berada dalam larutan dapar fosfat yang sudah sesuai dengan standar Mc Farland 0,5 merupakan larutan stok bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Komposisi larutan dapar fosfat (LDF) adalah campuran antara air dengan kalium dihidrogen fosfat dengan pH 7,2. Kemudian dilakukan pengukuran suspensi bakteri dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada lamda 612 nm dengan rentang panjang gelombang 0,08-0,13 setara dengan Mc Farland 0,5.

7. Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

7.1 Isolasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Suspense bakteri uji *Escherichia coli* diinokulasi pada media differensial *Endo Agar* (EA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni merah dengan kilap logam. Hal tersebut disebabkan karena bakteri *Escherichia coli* dapat memfermentasi laktosa sehingga menyebabkan warna medium *Endo Agar* (EA) disekitar koloni merah kilap logam. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasi secara goresan pada medium *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang sebelumnya ditambah telurit 1% kemudian diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang dihasilkan berwarna hitam dan warna medium di sekitar koloni berwarna kuning. Biakan murni bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175 diinokulasikan pada media BAP (*Blood Agar Plate*) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya bakteri berwarna hijau dalam agar darah (hemolisis alfa).

7.2 Pewarnaan. Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram dilakukan dengan membuat preparat oles *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Suspense bakteri di oleskan pada kaca objek. Kemudian kaca objek difiksasi, biasanya dengan pemanasan menyebabkan mikroorganisme melekat pada kaca obyek. Preparat yang telah difiksasi kemudian ditetesi larutan Kristal ungu sebagai pewarna utama, diamkan selama ± 1 menit. cuci dengan aquadest mengalir, kemudian tetesi dengan larutan iodium, diamkan selama ± 1 menit kemudian cuci lagi dengan air mengalir, lalu kering anginkan. Preparat ditetesi alkohol selama 30 detik untuk melunturkan. Preparat ditetesi larutan safranin dan diamkan selama ± 45 detik, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian dikeringkan, kemudian amati di bawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 100x dan lensa okuler dengan perbesaran 10x.

7.3 Identifikasi secara biokimia pada *Escherichia coli* ATCC 25922

Pertama, uji biokimia SIM (Sulfida Indol Motilitas). Biakan bakteri ditanamkan pada media dengan cara ditusukkan ke media, kemudian diinkubasi

selama 24 jam dengan suhu 37⁰C. Uji sulfida positif jika pada media terbentuk warna hitam, uji indol dengan penambahan reagen Erlich apabila uji positif akan berwarna merah, uji motilitas positif apabila bakteri menyebar keseluruh media.

Kedua, uji KIA (Kliger's Iron Agar) merupakan media padat yang berbentuk mring dan berwarna merah. Biakan bakteri ditanamkan pada media dengan cara tusuk gores, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37⁰C. pengamatan dilakukan pada bagian atas yang miring, apabila berubah menjadi warna kuning berarti bakteri dapat memfermentasi laktosa dan glukosa. Pada bagian dasar ada tidaknya gas dan terbentuk warna hitam pada media.

Ketiga, uji LIA (Lysin Iron Agar) metode ini bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba penghasil enzim yang mampu mendekarboksilasi asam amino lisin dan memproduksi gas H₂S. Biakan bakteri diinokulasikan pada media LIA, media LIA berbentuk padat, dengan permukaan miring dan berwarna ungu. Bakteri ditanamkan pada media dengan cara tusuk gores. Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37⁰C. Diamati adanya perubahan warna merah coklat ungu, atau kuning, pada bagian lereng dan dasar media LIA. Perubahan warna hitam pada media LIA menunjukkan uji sulfida positif.

Keempat, uji Citrat. Media citrat berbentuk padat dengan permukaan miring dan berwarna hijau. Biakan bakteri diinokulasikan pada media citrat dengan cara tusuk gores., kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37⁰C. hasil positif apabila media berubah warna menjadi biru.

7.4 Identifikasi biokimia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada larutan dapar fosfat dan ditambah H₂O₂ 3%. Penambahan H₂O₂ akan terurai menjadi H₂ dan O₂. Hal ini ditandai dengan timbulnya gelembung udara. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara dan hasil negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung udara. *Streptococcus mutans* bersifat katalase negatif sehingga hasil yang terbentuk tidak terdapat gelembung udara, sedangkan pada *S. aureus* bersifat katalase positif sehingga terdapat gelembung oksigen karena adanya pemecahan H₂O₂ (Jawetz *et al* 2013).

Uji tabung digunakan untuk mengetahui adanya koagulase bebas dengan cara 200 µl plasma sitrat dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril. Sebanyak 3-4 koloni biakan *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus* yang diuji ditambahkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampur. Selanjutnya, tabung dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan pada 4 jam pertama, dan sesudah 18-24 jam. Reaksi positif akan terjadi apabila terbentuk *clot* atau *jelly* dan ketika tabung dimiringkan *jelly* tetap berada di dasar tabung (Lay 1994).

8. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

Minyak atsiri yang diperoleh dari daun beluntas secara destilasi diuji aktivitas antibakteri dengan bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Metode yang digunakan adalah metode difusi.

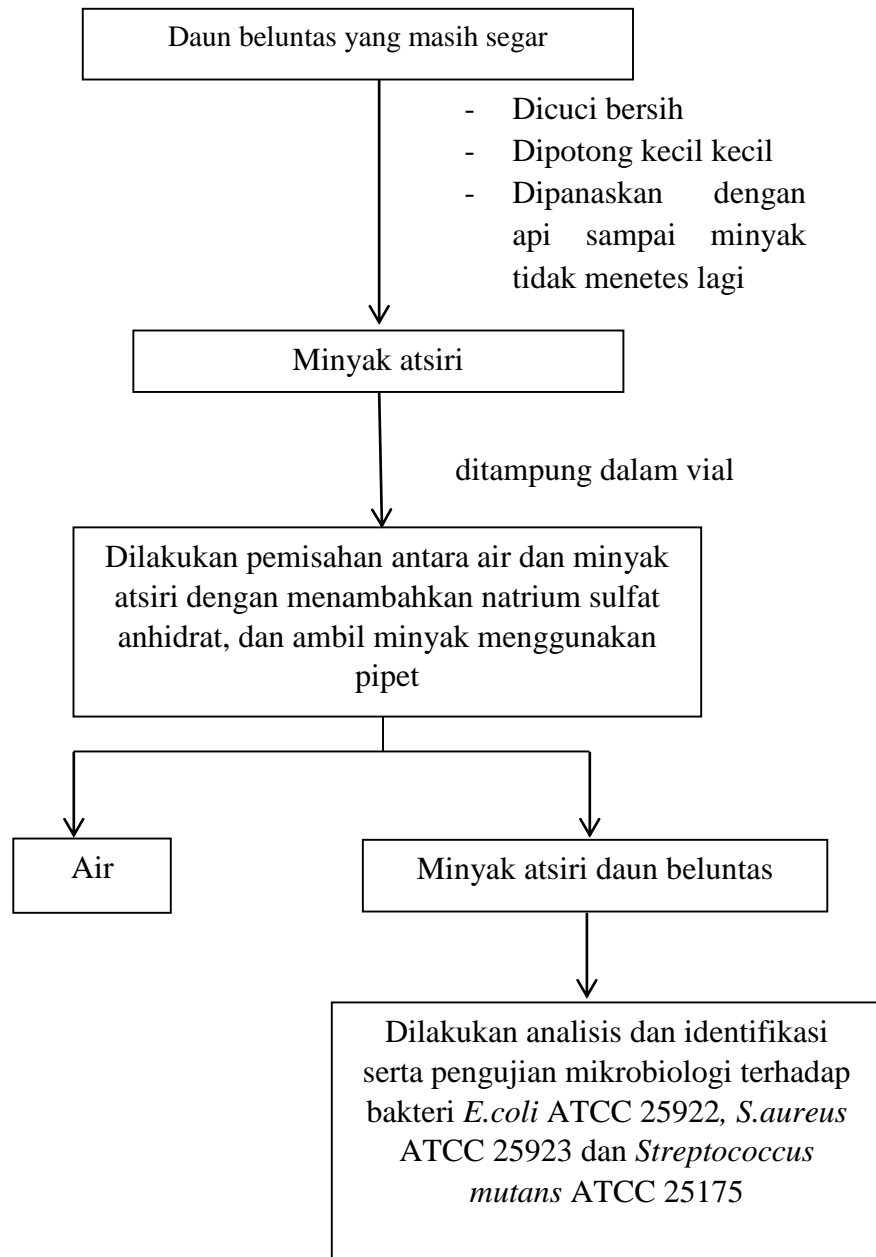
Metode difusi dilakukan dengan cara menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi yang telah dibuat dan ditekan-tekan pada ujung tabung, dioleskan pada media MHA (*Mueller Hilton Agar*) sampai rata. Cakram yang akan digunakan di sterilisasi terlebih dahulu. Cakram untuk kontrol positif yaitu kloramfenikol, kontrol negatif tween dan cakram yang lain ditetesi minyak atsiri daun beluntas 50 µl. Masa inkubasi 24 jam pada suhu 37°C, ada tidaknya daya hambat yang teramati dalam ukuran mm dibandingkan dengan kloramfenikol. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram yang berisi larutan uji menandakan bahwa minyak atsiri daun beluntas memiliki daya hambat terhadap bakteri uji. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali.

E. Analisis Data

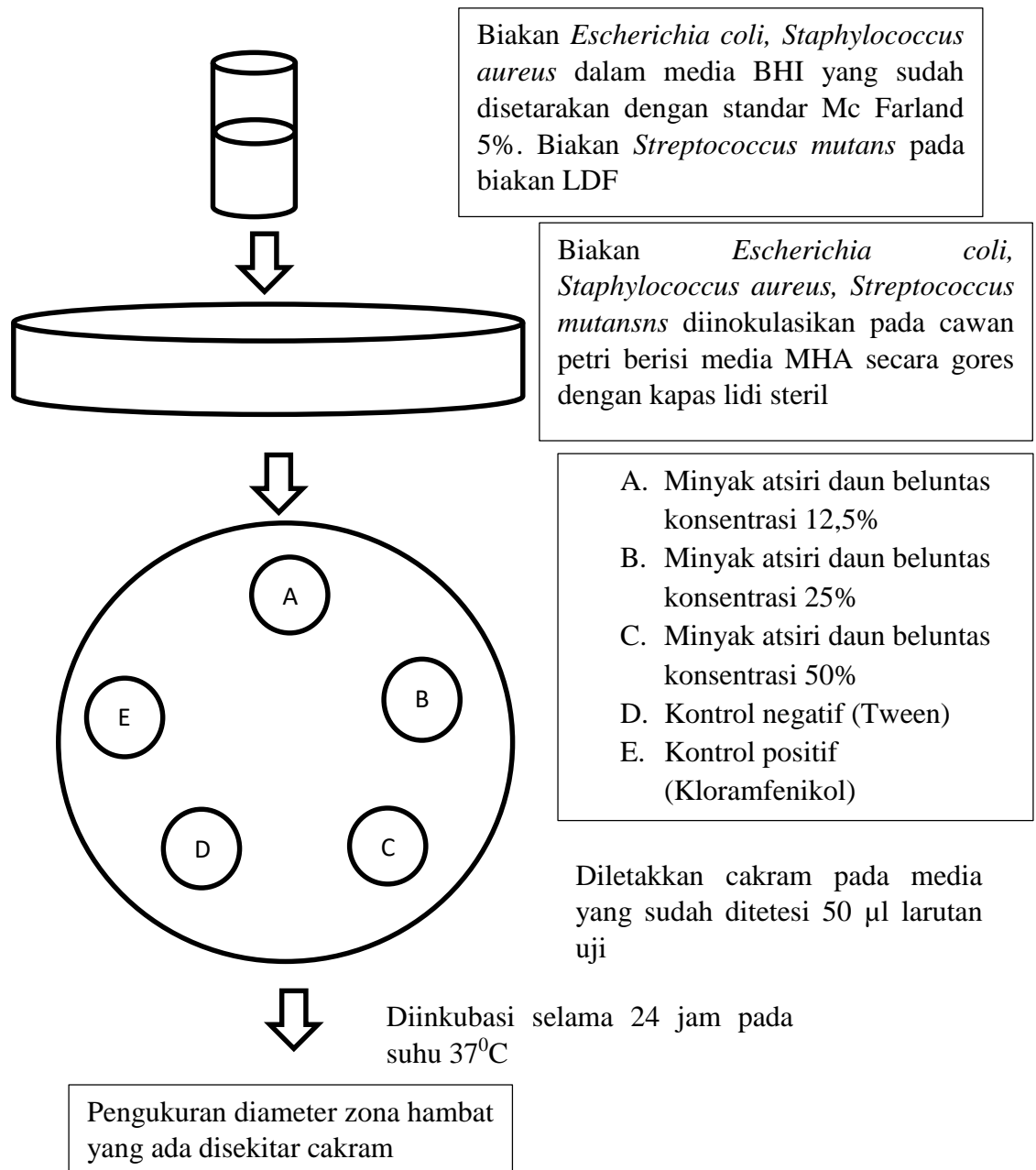
Data yang diperoleh dari metode ini berupa nilai besarnya zona hambat atau zona bening dari konsentrasi minyak atsiri daun beluntas dalam milimeter. Besarnya nilai zona hambat atau zona bening yang dihasilkan dari kontrol positif dan perlakuan pada bakteri yang sama dianalisis dengan metode Kolmogorov-Smirnov. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan *analysis of varian* (ANOVA) dua jalan dengan taraf kepercayaan 95%.

Lanjutkan dengan uji Turkey untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka dilanjutkan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan uji Mann-Whitney untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya.

F. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema isolasi minyak atsiri daun beluntas



Catatan: Pengujian *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* dilakukan masing-masing secara terpisah

Gambar 6. Skema pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri daun beluntas terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* dengan metode difusi

