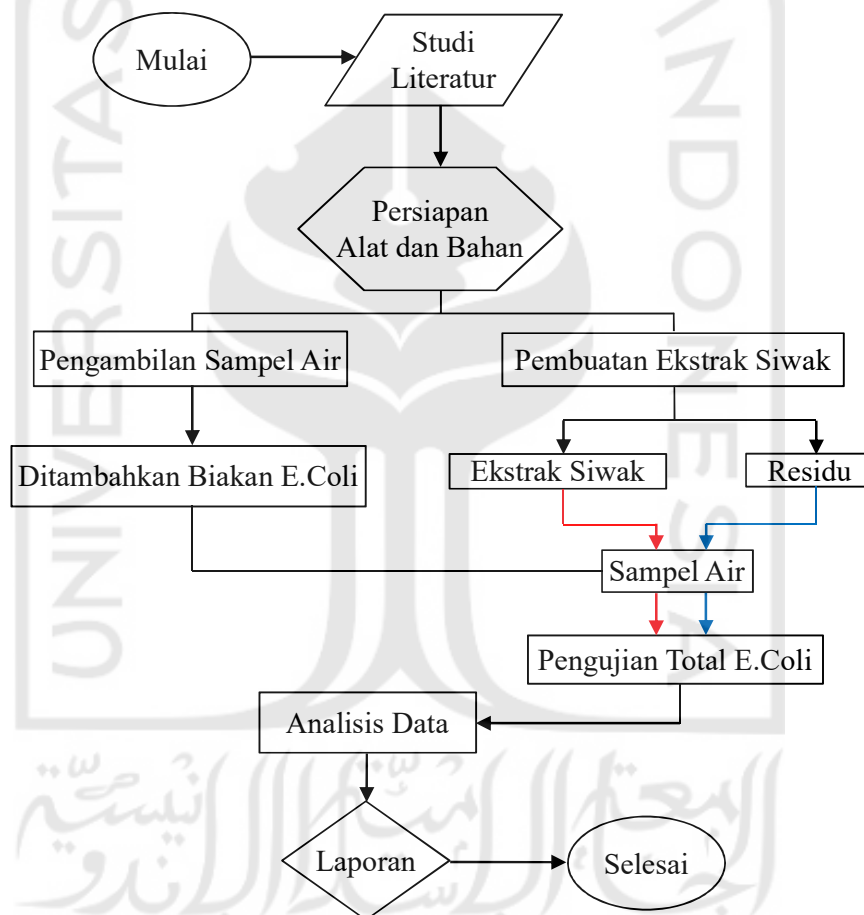


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Kerangka dan Diagram Alir Penelitian

Penelitian dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut (Gambar 3.1.).



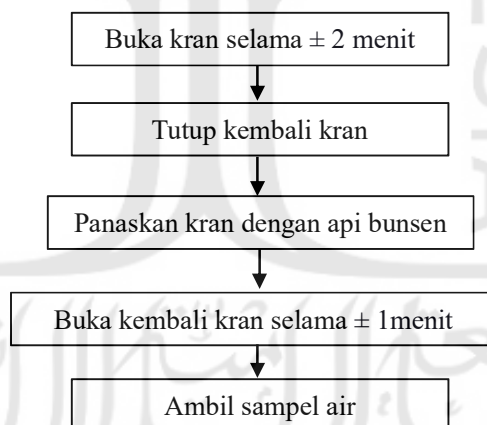
Gambar 3.1. Kerangka Penelitian

3.1.1. Studi Literatur

Studi literatur merupakan tahapan yang dilakukan untuk mengetahui teori yang dapat dijadikan landasan penelitian. Studi literatur meliputi metode standar sampling, metode pengujian, serta definisi pendukung terkait penelitian. Referensi dari studi literatur dapat berasal dari buku, jurnal, dokumen pemerintahan, dan sumber lainnya yang dapat dipertanggungjawabkan secara akademik.

3.1.2. Pengambilan Sampel Airtanah

Sampel air diambil dari airtanah di sekitar Universitas Islam Indonesia dengan metode SNI 06-2412-1991 tentang Metode Pengambilan Contoh Kualitas Air melalui kran air yang tersedia. Sampel air diambil secara acak dengan syarat tidak pernah mengalami pengolahan apapun, khususnya disinfeksi, agar pengujian parameter Total E.Coli tidak terganggu oleh adanya disinfektan lain pada air.



Gambar 3.2. Metode Pengambilan Sampel Airtanah

Pengambilan sampel airtanah dilakukan seperti pada gambar 3.2., yaitu dengan membuka kran air selama ± 2 menit kemudian kran ditutup kembali. Hal ini dimaksudkan untuk membersihkan saluran air dari keberadaan

mikroorganisme yang hidup selama kran air dalam keadaan kosong. Selanjutnya pemanasan merata pada mulut kran menggunakan api dilakukan supaya mikroorganisme yang terpapar dari udara luar dapat dihilangkan. Sebelum diambil, kran kembali dibuka selama ± 1 menit untuk memastikan sampel air homogen. Selama pengambilan sampel air harus diperhatikan teknik aseptik yang baik dan benar agar mikroorganisme pengganggu dapat dihindari.

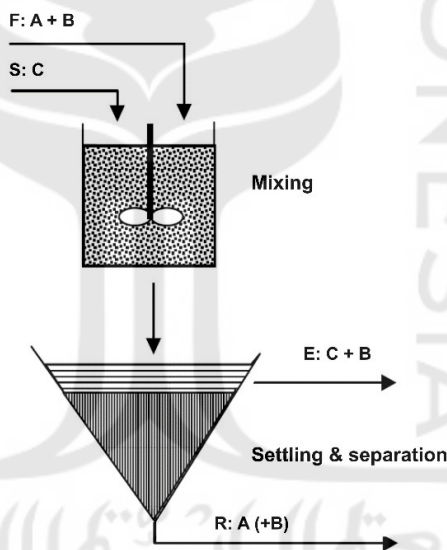
3.1.3. Pembuatan Ekstrak Siwak

Ekstraksi merupakan proses untuk memisahkan komponen dari suatu campuran dengan menggunakan pelarut tertentu dan menghasilkan dua macam fase, yaitu fase diperkaya (fase ekstrak) dan fase rafinasi. Di dalam ekstraksi terjadi beberapa peristiwa mikro, yaitu: persebaran senyawa-senyawa mudah larut dan interaksi kimia pada fase organik ataupun air bergantung pada pelarut yang digunakan. Oleh karena itu, kelarutan menjadi hal utama dalam pertimbangan pemilihan pelarut untuk ekstraksi. Kelarutan suatu zat dipengaruhi oleh gaya-gaya van der Waals serta gaya-gaya London dari zat pelarut dan zat terlarutnya yang dapat merupakan kombinasi non polar-polar atau sebaliknya. Untuk menyatakan kemampuan suatu pelarut dalam melarutkan zat tertentu digunakan koefisien/konstanta distribusi yang membandingkan antara rafinat dan ekstraktan. Semakin besar nilai koefisien maka kemampuannya semakin baik (Chemat and Vian, 2014; Gozan, 2006; *IPE Separation Process Laboratory*, 2014; Wonorahardjo, 2013).

Dalam aplikasinya, ekstraksi senyawa aktif pada tanaman siwak dapat dilakukan dengan pelarut heksan, etanol, metanol, dan air. Hal ini dikarenakan di dalam siwak mengandung senyawa antibakteri polar dan non polar, sehingga berbagai pelarut dapat digunakan. Namun, dalam pertimbangan penggunaan prinsip *Green Solvents*, yaitu pelarut ramah lingkungan yang tidak bersifat volatil, tidak beracun, tidak mudah terbakar, stabil, serta dapat didaur ulang, air dipilih sebagai pelarut utama (Chemat and Vian, 2014). Selain karena penggunaan air yang memang diterapkan dalam penggunaan siwak sehari-hari. Sedangkan

metode ekstraksi konvensional berupa *One Stage Extractor*, diaplikasikan dalam pembuatan ekstraksi siwak disebabkan energi yang digunakan sedikit dan kemudahan dalam proses ekstraksi.

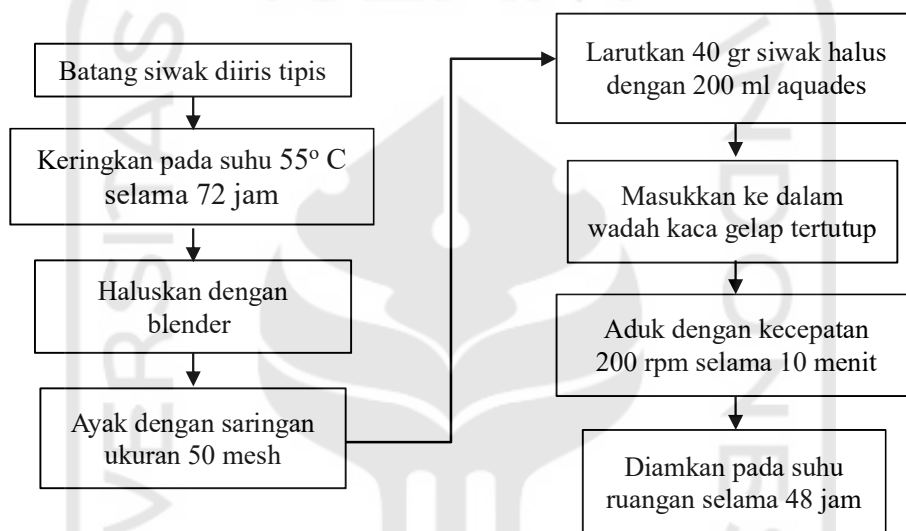
Ekstraksi satu tingkat (*one stage extractor*), dilakukan dengan dua tahap utama. Pertama, bahan yang digunakan, dalam hal ini siwak (*Feed; F*) dicampurkan dengan air sebagai pelarut (*Solvent; S*), untuk mencapai laju perpindahan massa yang tinggi siwak dihaluskan sehingga luas permukaan kontak antara siwak dan air dapat lebih besar. Keseimbangan yang merupakan tanda berakhirnya laju perpindahan massa dicapai saat suhu, tekanan, dan potensial kimia memiliki nilai setara antara siwak dan air. Tahap kedua dari ekstraksi satu tingkat adalah pengendapan untuk memisahkan ekstrak siwak (*Extract; E*) dan rafinat siwak (*Raffinate; R*) (Gambar 4.1.).



Gambar 3.3. Ekstraksi Satu Tingkat (*One Stage Extractor*) (IPE Separation Process Laboratory, 2014)

Senyawa yang diinginkan berada di dalam ekstrak adalah senyawa polar (B), seperti *oxygenated monoterpene* seperti 1,8-Cineole serta anion (Cl^- dan SO_4^{2-}). Sedangkan pada residu (rafinat), senyawa non polar yang mendominasi yaitu *benzylisothiocyanate* (BITC). Meskipun diketahui seluruh senyawa dominan pada ekstrak dan residu tersebut memiliki kemampuan antibakteri, ekstrak siwak

yang berbasis pada *Green Solvents* ini tetap digunakan untuk menunjukkan sejauh mana kemampuan ekstrak siwak dalam mengurangi keberadaan bakteri *E.Coli* pada media air. Rafinat juga digunakan dalam proses penyisihan bakteri *E.Coli* tersebut sebagai data pembandingan dan karena alasan untuk meminimalisasi limbah yang dibuang (Abhary and Al-Hazmi, 2016; Alali et al, 2004; Al-Shohaibani and Murugan, 2012; Darout et al, 2000; Farag et al, 2017; Noumi et al, 2011).



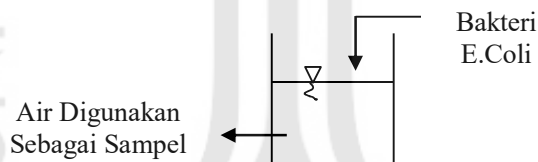
Gambar 3.4. Proses Ekstraksi Siwak

Proses ekstraksi dimulai dengan menyediakan batang siwak dengan ukuran sekitar 20 cm yang dapat ditemukan di pasaran. Pembuatan ekstrak dilakukan sesuai dengan metode yang digunakan oleh Abhary dan Al-Hazmi (2016). Batang siwak diiris hingga berukuran kecil untuk kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 55° C selama 72 jam. Siwak kering dihaluskan hingga ukuran <0,3 mm menggunakan *blender* dan ayakan ukuran 50 mesh. Ukuran <0,3 mm dipilih karena ukuran tersebut dapat mencakup keseluruhan batang siwak yang telah dihaluskan. Menurut Tan et al (2014), salah satu ukuran partikel optimal dalam ekstrak tanaman menggunakan air dengan prinsip *solvent extraction* adalah <1 mm, bahkan Makanjuola (2017) menggunakan ukuran partikel terkecil sebesar 0,425 mm untuk prinsip tersebut.

Ekstrak siwak dibuat dengan melarutkan 40 gram siwak halus ke dalam 200 mL aquades dan digoyangkan pada kecepatan 200 rpm selama 10 menit. Larutan siwak berikutnya didiamkan selama 48 jam di suhu ruangan pada botol kaca gelap. Kemudian disaring menggunakan kertas filter Whatman No. 1 dengan ukuran pori 11 μm untuk memisahkan zat terlarut dan zat yang tidak terlarut. Tahap terakhir, filtrat dan residu dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40°C selama 72 jam sebelum siap diuji.

3.1.4. Penyisihan Bakteri *Escherichia coli*

Proses penyisihan bakteri E.Coli dilakukan terhadap sampel air yang telah dimasukkan biakan E.Coli dan dihomogenkan. Namun ekstrak atau residu ditambahkan terlebih dahulu dengan dosis yang ditentukan dan dibiarkan pada waktu kontak tertentu. Hal ini bermaksud untuk mengetahui kemampuan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak maupun residu dalam mengurangi jumlah bakteri *Escherichia coli*. Residu siwak tetap digunakan dalam proses disinfeksi sebagai data tambahan.

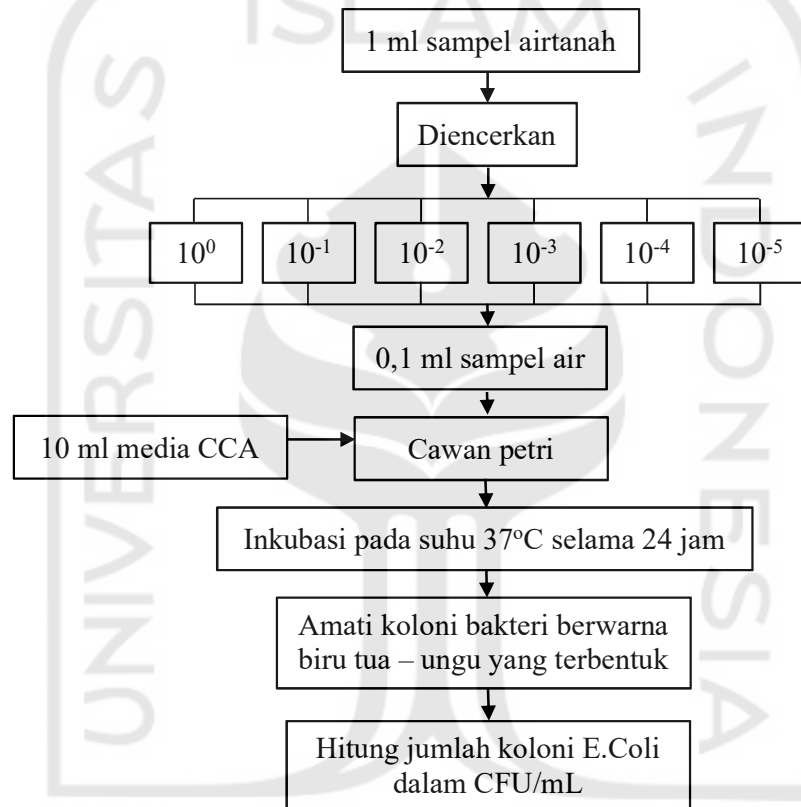


Gambar 3.5. Penambahan Biakan E.Coli ke dalam Sampel Airtanah

Jumlah koloni *Escherichia coli* ditentukan dengan ISO 9308-1: 2014 tentang *Enumeration of Escherichia coli and Coliform Bacteria* menggunakan media CCA (*Chromocult Coliform Agar*) pada cawan petri dengan waktu inkubasi 24 jam di suhu 37°C. Pengenceran sampel dilakukan hingga 10^{-5} , untuk melihat kuantitas koloni secara objektif. Koloni E.Coli akan terbentuk berwarna biru tua hingga ungu yang kemudian dihitung dengan instrumen *Colony Counter*.

Adapun variasi dosis yang ditambahkan adalah 1, 5, 10, dan 15 mL untuk ekstrak siwak, sedangkan untuk variasi dosis residu yaitu 1, 5, 10, dan 15 mg.

Variasi dosis pada ekstrak dan residu siwak merupakan variabel bebas sama halnya dengan waktu kontak optimum yang ditentukan diantaranya 1, 5, 10, 15, 30, dan 60 menit. Semua sampel digoyangkan pada kecepatan 200 rpm sesuai dengan waktu kontak tersebut. Untuk setiap pengujian, ditetapkan pula kontrol tanpa adanya penambahan ekstrak ataupun residu untuk mengetahui kondisi awal Total E.Coli.



Gambar 3.6. Uji Total *Escherichia coli*

Setelah koloni E.Coli dihitung menggunakan persamaan 3.1., dilakukan analisis penyisihan koloni E.Coli akibat dari penambahan ekstrak maupun residu siwak dengan membandingkannya dengan kontrol, baik melalui persentase penyisihan maupun melalui perhitungan log reduksi (Persamaan 3.2. dan Persamaan 3.3.). Hasil tersebut diolah kembali untuk menentukan dosis dan

waktu kontak optimum. Kemampuan ekstrak dan residu siwak dalam proses penyisihan bakteri E.Coli juga disajikan dengan persamaan 3.4 melalui nilai kematian. Nilai laju kematian bakteri memiliki fungsi dalam menunjukkan seberapa lama suatu senyawa dapat melakukan disinfeksi terhadap bakteri sekaligus sebagai acuan waktu dimana diperlukan dosis tambahan.

$$\text{Total E.Coli } \left(\frac{\text{CFU}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{Jumlah Koloni}}{\{\text{Pengenceran Sampel} \times \text{Volume Sampel (mL)}\}}$$

(Persamaan 3.1.)

$$\text{Penyisihan Koloni Bakteri (P)} = \frac{N_0 - N}{N_0} \times 100\%$$

(Persamaan 3.2.)

$$\text{Log reduksi (L)} = -(\log_{10} (-P/100 + 1))$$

(Persamaan 3.3.)

$$N = N_0 e^{-kt} \quad k = - \left[\frac{\ln \left(\frac{N}{N_0} \right)}{t} \right]$$

(Persamaan 3.4.)

Dimana:

N : Total E.Coli pada waktu (t)

N_0 : Total E.Coli pada waktu (t=0)

k : Laju kematian bakteri (1/menit)

t : Waktu kontak (menit)