

### BAB III

#### METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode eksperimental di laboratorium. Isolasi minyak atsiri bunga cengkeh dilakukan dengan metode destilasi uap dan air. Identifikasi komponen senyawa kimia yang terdapat pada minyak atsiri bunga cengkeh dilakukan dengan metode GC-MS. Uji aktivitas antibakteri minyak atsiri dilakukan dengan metode *gaseous contact* menggunakan *airtight box*.

#### 3.1 Bahan dan Alat

##### 3.1.1. Bahan

- a. Bahan utama: simplisia bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang diperoleh dari Merapi Farma, Yogyakarta.
- b. Bahan untuk identifikasi simplisia bunga cengkeh: kaca preparat, kloralhidrat.
- c. Bahan untuk proses destilasi: aquades,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .
- d. Bahan untuk uji aktivitas antibakteri: aluminium foil, *Escherichia coli* strain, *Staphylococcus aureus* strain, DMSO, *double tape*, kapas, kertas payung, kertas saring (diameter = 9 cm), larutan standar McFarland, lilin (malam), *Mueller-Hinton agar* (MHA), dan *Mueller-Hinton broth* (MHB).

##### 3.1.2. Alat

- a. Alat untuk identifikasi simplisia bunga cengkeh: mikroskop.
- b. Alat untuk destilasi : seperangkat alat destilasi uap dan air, peralatan gelas.
- c. Alat untuk identifikasi kandungan senyawa kimia minyak atsiri: GC-MS Shimadzu QP2010 SE.

- d. Alat untuk uji aktivitas antibakteri: *airtight box*, autoklaf, bunsen, cawan petri, inkubator, *Laminar Air Flow* (LAF), lemari pendingin, *microwave*, mikropipet, ose, dan perangkat gelas.

## 3.2 Cara Penelitian

### 3.2.1 Pengumpulan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia bunga cengkeh (*S. aromaticum* L.) yang diperoleh dari Merapi Farma, Yogyakarta.

### 3.2.2 Identifikasi Simplisia Bunga cengkeh

Identifikasi simplisia bunga cengkeh dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik di Laboraturum Biologi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta dengan mengacu pada Materi Medika Indonesia Jilid IV untuk memastikan bahwa simplisia yang digunakan benar-benar bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.).

### 3.2.3 Isolasi Minyak Atsiri Bunga Cengkeh

Proses isolasi dilakukan dengan metode destilasi uap-air. Sebanyak 1 kg bahan didestilasi selama 4 jam, diukur mulai dari tetesan kondensat pertama. Destilat yang diperoleh ditambahkan natrium sulfat anhidrat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) untuk memisahkan minyak dan air kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin hingga siap digunakan. Minyak atsiri yang diperoleh digunakan sebagai sampel untuk proses selanjutnya.

### 3.2.4 Identifikasi kandungan senyawa dengan GC-MS

Analisis kandungan senyawa dalam minyak atsiri dilakukan dengan menggunakan alat GC-MS. Minyak atsiri bunga cengkeh bersifat volatil sehingga menurut *National Chemistry Instrumentation Center* (NCIC) dilakukan analisis senyawa kimia menggunakan GC-MS. Analisis dilakukan dengan parameter identifikasi sebagai berikut:

- a. Volume injeksi : 0,1  $\mu\text{L}$

- b. Fase gerak : Helium
- c. Fase diam : RTX-5MS
- d. Suhu injektor : 250°C
- e. Suhu detector MS : 200°C
- f. Suhu kolom : 60-300°C dengan kecepatan 10<sup>0</sup>/menit
- g. Laju alir : 0,75 ml/menit
- h. Bank data : Willey

### 3.2.5 Persiapan untuk Uji Antibakteri

#### a. Sterilisasi Alat

Alat dan media yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama ±15 menit dan *airtight box* disterilkan dengan *swab* alkohol kemudian dilapisi dengan aluminium foil dan diletakkan di bawah sinar UV selama 30 menit.

#### b. Pembuatan Seri Konsentrasi Minyak Atsiri

Minyak atsiri bunga cengkeh hasil isolasi dilarutkan dengan DMSO sehingga didapat konsentrasi 25; 12,5; 6,25; 3,13; dan 1,56% dengan volume akhir 1 mL.

#### c. Pembuatan Media Agar Miring

Sebanyak 0,95 gram MHA dilarutkan dalam 25 mL aquades, kemudian dipanaskan dengan *microwave* sampai warna kuning bening. Masukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Tutup tabung reaksi dengan kapas dan aluminium foil. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Tempatkan ditempat yang miring dan diamkan sampai padat pada suhu kamar.

#### d. Pembuatan Biakan Bakteri

Sebanyak 1 ose isolat bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dibiakkan pada media agar miring MHA dengan pola zig-zag, masing-masing bakteri dibuat 2 biakan bakteri. Lakukan dalam keadaan steril pada ruang isolasi dengan sinar UV atau di dalam LAF. Kemudian inkubasi biakan pada suhu 37°C selama 24 jam.

e. Pembuatan Media *Broth*

Sebanyak 0,63 gram MHB dilarutkan dalam 30 mL aquades, kemudian dipanaskan dengan *microwave* sampai warna kuning bening. Masukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Tutup tabung reaksi dengan kapas dan aluminium foil. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

f. Pembuatan suspensi bakteri

Koloni *E. coli* dan *S. aureus* hasil biakan diambil dengan ose steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 5 mL MHB. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian setarakan kekeruhannya dengan standar *McFarland*. Jumlah bakteri yang memenuhi syarat untuk uji kepekaan yaitu:  $10^5$ - $10^8$  CFU/ml.

g. Pembuatan media agar untuk cawan petri

Sebanyak 24,7 gram MHA dilarutkan dalam 650 mL aquades. Larutan MHA dipanaskan dengan *microwave* dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dituang 20 mL media MHA steril pada cawan petri dan didiamkan hingga memadat.

### 3.2.6 Uji Efek Antibakteri dengan Metode *Gaseous Contact*

Disiapkan *airtight box* dengan volume 1,3 L yang telah dilapisi dengan aluminium foil untuk melindungi dinding *airtight box* dari paparan minyak atsiri yang sulit dibersihkan. Lilin (malam) ditempelkan di tepi bagian atas *airtight box* untuk mencegah kebocoran udara.

Cawan petri yang berisi masing-masing 20 mL media MHA yang telah memadat, disebar di permukaannya dengan 10  $\mu$ L suspensi bakteri dengan menggunakan *spreader*, kemudian dimasukkan ke dalam *airtight box*. Kertas saring dimasukkan ke dalam *airtight box* dan ditempelkan ke dinding *airtight box* dengan menggunakan *double tape*, kemudian diteteskan minyak atsiri sebanyak 260  $\mu$ L dari masing-masing seri konsentrasi minyak atsiri dengan menggunakan mikropipet. Masing-masing konsentrasi dibuat 3 kali replikasi. Kontrol disiapkan dengan meneteskan 260  $\mu$ L DMSO ke kertas saring. Kontrol digunakan untuk

melihat ada atau tidaknya efek dari pelarut. *Airtight box* kemudian ditutup dan bagian tutupnya dilapisi lagi dengan selotip untuk mencegah kebocoran udara. Semua *airtight box* di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Didapat nilai MID yang menunjukkan konsentrasi terkecil dalam menghambat pertumbuhan bakteri pada sistem tertutup.

### 3.3 Analisis Hasil

Pengujian efek antibakteri dengan menggunakan metode *gaseous contact* terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* akan didapat nilai *Minimal Inhibitory Dose* (MID). MID merupakan dosis minimal untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme dalam sistem tertutup. MID dari minyak atsiri bunga cengkeh tercatat dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* secara visual. Nilai MID dinyatakan dengan satuan volume per unit volume ( $\mu\text{L/L}$  udara). Analisis kandungan senyawa dalam minyak atsiri bunga cengkeh yang dilakukan dengan menggunakan GC-MS akan diperoleh dua data yaitu kromatogram dan spektra massa, kemudian dibandingkan dengan literatur.