

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium mengenai efek antibakteri minyak atsiri nilam terhadap bakteri *Eschericia coli*

B. Tempat dan waktu

Dilakukan dilaboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Universitas Ahmad Dahlan pada bulan Oktober 2018 -Januari 2019

C. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah nilam (*Pogostemon cablin Benth*) dan bakteri *Eschericia coli*

D. Identifikasi variabel penelitian dan definisi operasional

a) Variabel penelitian

1. Variabel bebas: kadar Minyak Nilam
2. Variabel tergantung : Diameter zona inhibisi (DZI)
3. Variabel terkontrol :
 - a *Eschericia coli*
 - b Inkubasi 24 jam
 - c Suhu inkubasi bakteri

d Media pertumbuhan bakteri

4. Variabel tak terkendali: Zat aktif dalam nilam

b) Definisi operasional

Diameter zona inhibisi (DZI) adalah diameter yang menunjukkan hambatan suatu senyawa antibakteri terhadap bakteri yang diuji dan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

E. INSTRUMEN PENELITIAN

Alat utama : alat GC-MS-, ose steril untuk mengambil bakteri, lidi kapas, pipa, cawan petri, pipet dan mikro pipet, lampu busen, timbangan analik , autoklaf, kapas lidi, LAF dan inkubator

Bahan utama : Minyak atsiri nilam (happy Gren), bakteri *Eschericia coli* ATCC 25922, aquades, Tween 80 , NaCl 0,9 % , dan NA (Nutrien Agar)

F. CARA KERJA

a. Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (Shimadzu[®]) (GC-MS)

Uji GC-MS dilakukan untuk mengidentifikasi komponen minyak atsiri nilam. Kondisi alat GC-MS sebagai berikut :

<i>Column Oven Temp.</i>	:60.0 °C
<i>Injection Temp.</i>	:125.00 °C
<i>Injection Mode</i>	: <i>Splitless</i>
<i>Sampling Time</i>	:1.00 min
<i>Flow Control Mode</i>	:Pressure
<i>Pressure</i>	:21.6 kPa
<i>Total Flow</i>	:75.6 mL/min

<i>Column Flow</i>	:0.60 mL/min
<i>Linear Velocity</i>	:28.3 cm/sec
<i>Purge Flow</i>	:3.0 mL/min

b. Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan harus dilakukan sterilisasi terlebih dahulu alat-alat yang berbahan gelas disterilisasikan dengan menggunakan oven pada suhu 150⁰C selama 1 jam. Ose distreilkan dengan menggunakan bunsen. Bahan-bahan seperti nutrien agar disterilkan menggunakan autoclaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit (Pratiwi 2008). Pengerjan uji mikrobiologi dilakukan secara aseptis didalam lemari aseptif yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol 70% lalu disinari dengan lampu UV yang dinyalakan selama 15 menit sebelum digunakan

c. Pembuatan Stok variabel konsentrasi

Variabel yang digunakan pada penelitian kali ini yaitu 4 variabel, kontrol negative yaitu tween 80, variasi konsentrasi minyak nilam yaitu 50%, 60%, 70%, dan 80% dengan menggunakan pelarut tween 80%, dan kontrol positifnya menggunakan antibiotik.

d. Pembuatan media agar

Media agar yang digunakan yaitu nutrien agar (NA) sebanyak 2,8 gram dalam 100 ml aquades kemudian aduk dengan menggunakan batang pengaduk sampai dengan homogen kemudian sterilka larutan media NA dengan menggunakan autoclave pada suhu 121⁰C selamat 15 menit. Kemudain NA

dituakan kedalam cawan petri dalam kondisi aseptik dalam *Laminar Air Flow* dan ditunggu hingga mengeras.

e. Inokulasi Bakteri (peremajaan bakteri)

Inokulasi bakteri merupakan menumbuhkan atau memperbanyak bakteri dalam tabung reaksi yang dilakukan dalam inokulasi bakteri adalah diambil ose bakteri dan digoreskan dimedia agar lalu diinkubasi 37⁰C selamat 24 jam

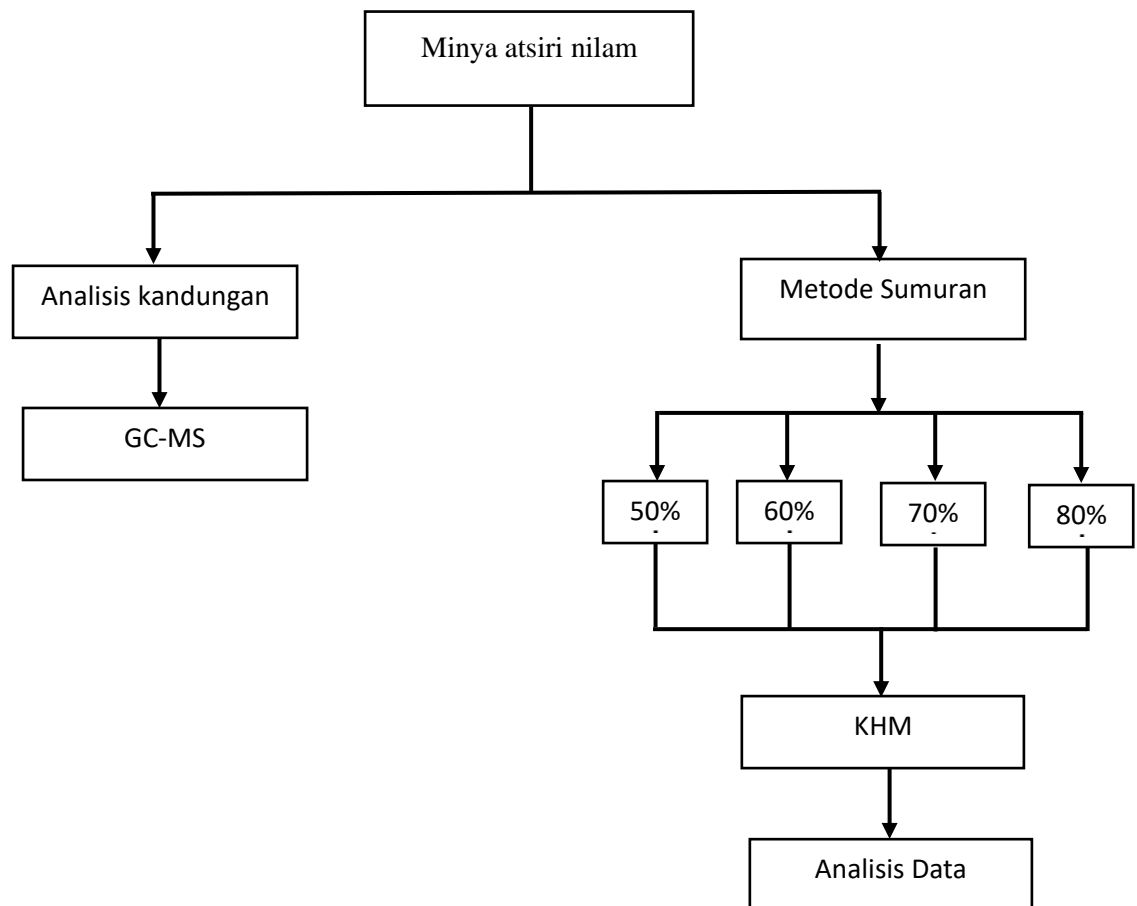
f. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri *Eschericia coli* diambil dengan kawat ose steril sebanyak 1 -2 ose disupensi kedalam tabung yang berisi dengan NaCl 0,9 % hingga diperoleh kekaruhan.

g. Uji aktivitas antibakteri dengan metode Sumuran

1. Cetakan sumuran dengan diameter ± 6 mm dengan tinggi ± 1 cm
2. Encerkan Bakteri d1-2 ose suspensi bakteri e coli kedalam tabung yang diisi dengan NaCl 0,9 %
3. Buat lubang pada media NA yang telah diinokulasikan bakteri dengan menggunakan alat pelubang
4. Masukkan konsentari minyak nilam dengan menggunakan mikropipet kedalam setiap lubang di media NA
5. Berikan masing-masing label pada lubangan sumuran dengan masing-masing konsentaris setra kontrol positif dan kontrol negatif
6. Diinkubasi kedalam inkubator pada suhu 37⁰c selama 24 jam
7. Amati dan ukur zona hambat yang terbentuk disekitar sumuran dengan menggunakan jangka sorong atau penggaris

G. Skema langka kerja



H. Analisis data

Data yang diperoleh pada saat analisis komponen minyak atsiri dengan GC-MS yaitu kromatogram GC akan diperoleh informasi jumlah senyawa yang terdeteksi sedangkan dari spektra MS akan didapatkan struktur senyawa dengan membandingkannya dengan data sekunder dari literatur. Uji antibakteri dengan metode sumuran akan diperoleh nilai diameter daerah hambat dari masing-masing bakteri uji kemudian dibuat variasi konsentrasi sampel secara menurun untuk menentukan Diameter zona inhibisi (DZI)

Setelah dilakukan penelitian, data hasil disajikan dengan membuat tabel hasil penelitian. Untuk hasil analisis diameter zona inhibisi dilakukan dengan uji statistika nonparametrik dengan kruskal wallis.