

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian seperti isolasi dan karakterisasi minyak atsiri biji adas pahit (kecuali penentuan indeks bias) dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya (FMIPA UB). Penentuan indeks bias minyak atsiri biji adas pahit dilakukan di Laboratorium Kimia Fisik Jurusan Kimia FMIPA UB. Analisis komponen minyak atsiri biji adas pahit menggunakan Kromatografi Gas-Spektrometri Massa (KG-SM) dilakukan di UPT Instrumentasi Jurusan Kimia FMIPA UB. Uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FK UB. Determinasi biji adas pahit dilakukan di UPT Materia Medica, Batu. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga Juni 2017.

3.2. Alat dan instrumen penelitian

3.2.1. Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat distilasi uap seperti yang disajikan pada Lampiran F.2, erlenmeyer kapasitas 25 mL, piknometer kapasitas 1 mL, pengaduk gelas, pengaduk besi, corong plastik, corong gelas, pipet tetes, cawan porselen, mortar dan *pestle*, tanur, desikator, kompor listrik, botol semprot, pompa air, botol 5 mL, tabung reaksi ukuran 16x150 mm, jarum ose, cawan petri, mikropipet kapasitas 100 μ L, *cotton swab*.

3.2.2. Instrumen penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini antara lain neraca digital merek Sartorius tipe BSA2245-CW, Kromatografi Gas-Spektrometri Massa (KG-SM) merek Shimadzu GCMS-QP2010S, refraktometer merek Fisher Scientific, inkubator merek WTB-Binder, Spektrofotometer UV merek Smart Spec Plus, dan vortex mixer merek V-1000.

3.3. Bahan penelitian

3.3.1. Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji adas pahit (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) yang

diperoleh dari Toko Jamu di Malang, akuades, es, batu didih, magnesium sulfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), gas nitrogen (N_2), *nutrient broth* (media cair), *nutrient agar* (media padat), larutan natrium klorida ($NaCl$), kertas cakram kosong (*blank disk*) dan kertas cakram antibiotik sefoksitin.

3.3.2. Bakteri uji

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FK UB.

3.4. Tahapan penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan penelitian (diagram alir penelitian disajikan pada Lampiran A.1), antara lain:

1. Preparasi alat dan persiapan bahan penelitian yang digunakan.
2. Determinasi sampel biji adas pahit yang digunakan.
3. Pembuatan $MgSO_4$ anhidrat dengan memanaskan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.
4. Isolasi minyak atsiri dari biji adas pahit menggunakan distilasi uap.
5. Karakterisasi sifat fisik minyak atsiri biji adas pahit berdasarkan penentuan wujud, warna, aroma, indeks bias, dan berat jenis.
6. Identifikasi minyak atsiri biji adas pahit menggunakan KG-SM.
7. Uji aktivitas antibakteri *S. aureus* dari minyak atsiri biji adas pahit dengan metode difusi cakram.
8. Analisis data yang meliputi rendemen, karakteristik sifat fisik, profil komponen, dan aktivitas antibakteri dari minyak atsiri biji adas pahit.

3.5. Prosedur kerja penelitian

3.5.1. Preparasi alat dan persiapan bahan penelitian

Preparasi alat dilakukan dengan cara satu set alat distilasi uap dirangkai seperti pada Lampiran F.2. Kemudian dilakukan tes kebocoran terhadap rangkaian alat tersebut. Pada tes kebocoran, pompa sirkulasi yang diletakkan dalam ember berisi air dan es dinyalakan sehingga terjadi sirkulasi air pada kondensor. Kemudian uap air dari ketel uap dialirkan pada rangkaian alat distilasi uap.

Persiapan bahan dilakukan dengan cara sampel biji adas pahit disiapkan sebagian untuk determinasi dan disiapkan sebagian lainnya untuk ditimbang sebanyak 350 gram. Biji adas pahit disimpan dalam wadah kaca tertutup agar tidak terkena sinar.

3.5.2. Determinasi biji adas pahit

Determinasi biji adas pahit dilakukan di UPT Materia Medica, Batu (hasil determinasi dilampirkan pada Lampiran F.1).

3.5.3. Pembuatan magnesium sulfat anhidrat ($MgSO_4$)

$MgSO_4$ anhidrat dibuat dengan cara sebanyak 50 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ditimbang dalam cawan porselen dan dipanaskan dalam tanur pada temperatur 300-350 °C selama 4 jam. Pemanasan menyebabkan terbentuknya $MgSO_4 \cdot (7-x)H_2O$. Setelah itu bongkahan $MgSO_4 \cdot (7-x)H_2O$ didiamkan sebentar, kemudian dimasukkan ke dalam desikator selama 1 jam dan ditimbang kembali. Padatan tersebut dipindahkan ke dalam mortar dan digerus hingga halus. Selanjutnya, serbuk dipindahkan kembali ke dalam cawan porselen dan dipanaskan dalam tanur pada temperatur 300-350 °C selama 1 jam. Lalu padatan tersebut didiamkan sebentar dan dimasukkan ke dalam desikator selama 1 jam. Kemudian ditimbang kembali. Proses pemanasan pada temperatur 300-350 °C selama 1 jam ini dilakukan berulang kali hingga diperoleh massa konstan. Massa hasil penimbangan dicatat. Data hasil penimbangan disajikan pada Lampiran B.1. Skema kerja pembuatan $MgSO_4$ anhidrat disajikan pada Lampiran A.2.1.

3.5.4. Isolasi minyak atsiri biji adas pahit

Isolasi minyak atsiri biji adas pahit dilakukan menggunakan metode distilasi uap. Langkah pertama yang dilakukan adalah satu set alat distilasi uap dirangkai seperti pada Lampiran F.2. Ketel uap diisi dengan air hingga 2/3 volume dan dipanaskan hingga mendidih. Sementara itu, sebanyak 350 g biji adas pahit dan beberapa potong batu didih dimasukkan ke dalam labu alas bulat, kemudian labu ditutup rapat. Setelah itu, pompa sirkulasi yang diletakkan dalam ember berisi air dan es dinyalakan sehingga terjadi sirkulasi air pada kondensor. Kemudian uap air dalam ketel uap yang telah mendidih dialirkan menuju labu alas bulat.

Proses distilasi uap dilakukan selama 5 jam yang dimulai dari tetesan pertama distilat. Distilat ditampung dalam corong pisah kapasitas 500 mL dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan air dan lapisan minyak atsiri biji adas pahit. Kemudian lapisan air dan minyak atsiri dipisahkan. Lapisan air ditampung dalam botol 1 L. Sedangkan lapisan minyak atsiri ditampung dalam erlenmeyer 25 mL dan ditutup rapat. Serbuk $MgSO_4$ anhidrat yang

telah ditimbang, ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam erlenmeyer 25 mL yang berisi minyak atsiri. $MgSO_4$ anhidrat ditambahkan sambil erlenmeyer digoyang. Penambahan $MgSO_4$ anhidrat dihentikan jika sudah tidak terbentuk bongkahan pada campuran. Sisa serbuk ditimbang kembali dan selisih penimbangan menunjukkan massa $MgSO_4$ anhidrat yang digunakan untuk proses penyerapan molekul H_2O pada minyak atsiri. Pada proses tersebut menghasilkan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ dan minyak atsiri bebas air. Setelah itu, minyak atsiri biji adas pahit dan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ dipisahkan dengan cara dekantasi. Selanjutnya, minyak atsiri ditampung dalam botol 5 mL dan dialiri dengan gas N_2 pada permukaan minyak atsiri. Minyak atsiri biji adas pahit yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya. Minyak atsiri disimpan dalam botol 5 mL tertutup dan dibungkus dengan aluminium foil pada lemari pendingin. Skema kerja isolasi minyak atsiri biji adas pahit disajikan pada Lampiran A.2.2.

3.5.5. Karakterisasi sifat fisik minyak atsiri biji adas pahit

Karakterisasi sifat fisik minyak atsiri biji adas pahit dilakukan berdasarkan penentuan wujud, warna, aroma, indeks bias, dan berat jenis.

a. Karakterisasi sifat fisik berdasarkan penentuan wujud, warna, dan aroma minyak atsiri biji adas pahit

Wujud dan warna minyak atsiri biji adas pahit ditentukan dengan pengamatan secara visual (mata). Aroma minyak atsiri biji adas pahit ditentukan secara organoleptik (pembau) dengan membandingkan minyak atsiri biji adas pahit dan biji adas pahit yang digunakan. Data sifat fisik minyak atsiri biji adas pahit berdasarkan wujud, warna, dan aroma disajikan pada Tabel 4.2.

b. Karakterisasi sifat fisik berdasarkan penentuan indeks bias minyak atsiri biji adas pahit

Indeks bias minyak atsiri biji adas pahit diukur menggunakan Refraktometer digital Fischer. Langkah pertama yang dilakukan adalah refraktometer disambungkan pada sumber listrik dan dinyalakan. Tempat sampel dibersihkan dengan meneteskan akuades pada prisma kaca dan dikeringkan menggunakan tisu. Kemudian minyak atsiri biji adas pahit diteteskan pada prisma kaca sebanyak 1 tetes dan ditutup. Setelah itu, tombol *read* ditekan untuk menampilkan angka yang menunjukkan indeks bias dan temperatur

pengukuran yang digunakan untuk perhitungan faktor koreksi. Perhitungan indeks bias minyak atsiri biji adas pahit dengan faktor koreksi disajikan pada Lampiran C.3. Data indeks bias minyak atsiri biji adas pahit hasil pengamatan dan terkoreksi disajikan pada Tabel 4.3.

c. Karakterisasi sifat fisik berdasarkan penentuan berat jenis minyak atsiri biji adas pahit

Berat jenis minyak atsiri biji adas pahit diukur menggunakan piknometer 1 mL. Piknometer yang digunakan belum dikalibrasi, sehingga dilakukan kalibrasi terlebih dahulu dengan cara piknometer dalam kondisi kosong dan bersih ditimbang. Kemudian akuades dipipet menggunakan pipet ukur 5 mL sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam piknometer. Selanjutnya, diberi tanda batas volume 1 mL (meniskus bawah) pada piknometer. Jika penimbangan menunjukkan massa air 1 mL adalah 1 g, maka piknometer telah dikalibrasi. Kemudian air dalam piknometer dikeluarkan dan piknometer dikeringkan. Setelah itu, piknometer diisi dengan minyak atsiri biji adas pahit hingga tanda batas dan ditimbang kembali. Temperatur ruang saat penimbangan dicatat sebagai temperatur pengukuran yang digunakan untuk perhitungan faktor koreksi. Perhitungan berat jenis minyak atsiri biji adas pahit hasil pengamatan dan dengan faktor koreksi berturut-turut disajikan pada Lampiran C.4 dan Lampiran C.5. Data berat jenis minyak atsiri biji adas pahit hasil pengamatan dan terkoreksi disajikan pada Tabel 4.4.

3.5.6. Analisis minyak atsiri biji adas pahit menggunakan Kromatografi Gas-Spektrometri Massa (KG-SM)

Analisis minyak atsiri biji adas pahit menggunakan KG-SM dilakukan dengan cara sebanyak 0,2 μ L masing-masing minyak atsiri biji adas pahit diinjeksikan menggunakan siring Hamilton ke dalam *injector port* pada instrumen KG-SM. Skema kerja analisis minyak atsiri biji adas pahit menggunakan KG-SM disajikan pada Lampiran A.2.3. Kondisi operasional KG-SM yang digunakan antara lain:

Tipe KG-SM	: Shimadzu GCMS-QP2010S
Tipe kolom	: Rtx-5MS (5% difenil, 95% dimetil polisiloksan)
Panjang kolom	: 30 meter
Temperatur kolom	: 70-215°C
Temperatur injektor	: 215°C

Temperatur detektor : 250°C
Detektor : FTD
Gas pembawa : Helium
Kec. Alir Gas : 3 mL/menit
Jenis Pengion : EI (Electron Impact) 70 eV

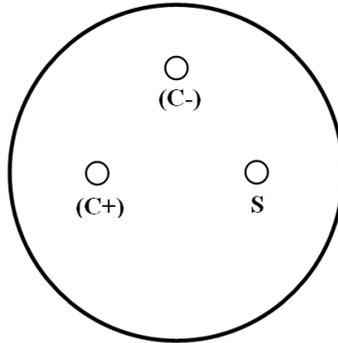
Data yang diperoleh adalah *Total Ion Chromatogram* (TIC) dan spektra massa dari minyak atsiri biji adas pahit. Berdasarkan TIC yang disajikan pada Gambar 4.4 sampai dengan Gambar 4.6, data tersebut, jumlah puncak pada TIC menunjukkan jumlah komponen minyak atsiri biji adas pahit. Sedangkan spektra massa, seperti yang disajikan pada Gambar 4.7 sampai dengan Gambar 4.9 dan Lampiran E, digunakan untuk menentukan jenis atau struktur komponen minyak atsiri biji adas pahit yang dapat dibandingkan dengan spektra standar dari pustaka WILEY7.LIB.

3.5.7. Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* minyak atsiri biji adas pahit dengan metode difusi cakram

Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* pada minyak atsiri biji adas pahit dilakukan dengan metode difusi cakram menggunakan kertas cakram berdiameter 6 mm. Koloni *S. aureus* dicuplik dari tabung biakan menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam media cair (komponen media cair untuk pembiakan bakteri disajikan pada Lampiran B.3) pada tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Setelah itu, diukur arbsobansinya menggunakan spektrofotometer. Suspensi *S. aureus* mempunyai nilai absorbansi 0,81, sehingga suspensi tersebut diambil sebanyak 0,8 mL dan diencekan dengan larutan NaCl hingga diperoleh absorbansi 0,1. Suspensi bakteri dihomogenkan menggunakan vortex mixer.

Media padat dituangkan ke dalam cawan petri berdiameter 90 mm. Komponen media padat untuk pembiakan bakteri disajikan pada Lampiran B.4. Suspensi bakteri *S. aureus* diambil menggunakan cotton swab dan dioleskan hingga merata pada permukaan media padat. Kemudian sebanyak dua kertas cakram kosong dan kertas cakram antibiotik sefoksitin diletakkan di atas media padat seperti yang disajikan pada Gambar 3.1. Sebanyak 15 µL minyak atsiri biji adas pahit (S) diteteskan pada permukaan salah satu kertas cakram kosong. Sebanyak 15 µL akuades, sebagai kontrol negatif (C-), diteteskan pada kertas cakram kosong lainnya. Cakram antibiotik

sefoksitin digunakan sebagai kontrol positif (C+). Kemudian diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri *S. aureus* diamati berdasarkan diameter daya hambat yang ditunjukkan dengan zona bening yang terbentuk di sekeliling cakram. Hasil uji aktivitas antibakteri *S. aureus* minyak atsiri biji adas pahit disajikan pada Gambar 4.14.



Gambar 3.1: *Template* posisi cakram pada cawan petri

