

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) yang diambil secara acak dari Desa Kebon Alas Kecamatan Manis Renggo Kabupaten Klaten, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi dan daun jeruk purut yang diambil secara acak dari populasi yang ada di Desa Kebon Alas Kecamatan Manis Renggo Kabupaten Klaten, Jawa Tengah. Daun kemangi yang diambil berwarna hijau, segar, bersih, bebas dari penyakit. Daun jeruk purut yang diambil berwarna hijau, segar, bersih, bebas dari penyakit.

B. Variabel Bebas

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah minyak atsiri dari daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.), beserta kombinasinya.

Variabel utama kedua penelitian ini adalah aktivitas antibakteri minyak atsiri dari daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.), beserta kombinasinya terhadap *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian adalah variabel yang direncanakan

untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung sedangkan pengertian variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan pengaruh selain variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung.

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah konsentrasi dari minyak atsiri daun kemangi, dan daun jeruk purut, dan kombinasi keduanya dengan perbandingan (1:1), (1:2), (1:3), (2:1), (3:1).

2.2. Variabel tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri minyak atsiri daun kemangi, daun jeruk purut, dan kombinasi keduanya dengan dilihat pertumbuhannya pada media uji.

2.3. Variabel terkendali. Variabel terkendali dalam penelitian ini merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu diperhatikan atau ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah minyak atsiri daun kemangi, minyak atsiri daun jeruk purut, bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, sterilisasi, suhu, kondisi peneliti, kondisi laboratorium, media yang digunakan dalam penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) adalah daun dari tanaman kemangi yang berwarna hijau, masih segar, bersih, bebas dari penyakit yang diambil secara acak dari kabupaten Klaten, Jawa Tengah.

Kedua, daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) adalah daun dari tanaman kemangi yang berwarna hijau, masih segar, bersih, bebas dari penyakit yang diambil secara acak dari kabupaten Klaten, Jawa Tengah.

Ketiga, minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut, adalah minyak atsiri hasil destilasi daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.), dengan menggunakan metode destilasi uap air.

Keempat, kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut, (1:1) adalah kombinasi dari minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut yaitu satu bagian minyak atsiri daun kemangi dan satu bagian minyak atsiri daun jeruk purut.

Kelima, kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut, (1:2) adalah kombinasi dari minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut yaitu satu bagian minyak atsiri daun kemangi dan dua bagian minyak atsiri daun jeruk purut.

Keenam, kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut, (2:1) adalah kombinasi dari minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut yaitu dua bagian minyak atsiri daun kemangi dan satu bagian minyak atsiri daun jeruk purut.

Ketujuh, kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut, (1:3) adalah kombinasi dari minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut yaitu satu bagian minyak atsiri daun kemangi dan tiga bagian minyak atsiri daun jeruk purut.

Kedelapan, kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut, (3:1) adalah kombinasi dari minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut yaitu tiga bagian minyak atsiri daun kemangi dan satu bagian minyak atsiri daun jeruk purut.

Kesembilan, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret.

Kesepuluh, kontrol positif dalam penelitian ini adalah cakram atau disk klindamisin mampu menghambat pertumbuhan bakteri dalam media uji.

Kesebelas, kontrol negatif dalam penelitian ini adalah cakram disk yang direndam dalam aqudest steril.

Keduabelas, kombinasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) dengan menggunakan metode difusi dengan cakram atau disk dengan konsentrasi 2%, 4%, 8%, aktivitas antibakteri dengan melihat diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dalam media uji

Ketigabelas, uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi yaitu berupa seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi berikut: 8%, 4%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,13%, 0,06%, 0,03%, 0,02%, kontrol negatif adalah kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut dan kontrol positif adalah suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

Keempatbelas, diameter zona hambat dalam media uji adalah garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi cakram yang berisi bahan uji dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat untuk pembuatan minyak atsiri yaitu kondensor dan dandang besar. Peralatan untuk uji mikrobiologi yaitu lampu spirtus, jarum ose tangkai panjang, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, cawan petri steril, kapas lidi steril, inkubator, cakram ukuran 6mm, mikropipet, autovortex mixer, gelas ukur, piper volume steril, botol vial steril, inkas, autoklaf, oven, pinset, neraca analitik dan penggaris.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam uji mikrobiologi antibakteri adalah minyak atsiri dalam daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.).

Bahan kimia yang digunakan antara lain tween 1%, Na₂SO₄ anhidrat dan klindamisin. media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mueler Hinton Agar* (MHA), *Mannitol Salt Agar* (MSA), *Vogel Johnson Agar* (VJA) *Brain Heart Infusion* (BHI), *Nutrient Agar* (NA)

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah determinasi tanaman, bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel daun kemangi dan daun jeruk purut yang berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis. Mecocokkan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman kemangi dan tanaman jeruk purut terhadap kepustakaan di

Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Pengambilan bahan

Daun kemangi dan daun jeruk purut yang diperoleh dari Desa Kebon Alas Kecamatan Manis Renggo Kabupaten Klaten, Jawa Tengah. Daun kemangi dan daun jeruk purut yang diambil yang berwarna hijau yang masih segar dan wangi, lalu dibersihkan dari kotoran yang menempel. Sebelum diproses, dirajang dahulu menjadi potongan-potongan kecil.

3. Isolasi minyak atsiri

Isolasi minyak atsiri dilakukan di Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Daun kemangi dan daun jeruk purut masing-masing yang telah dipotong kecil-kecil dimasukkan ke dalam alat penyulingan minyak dan air yang menyerupai dandang dengan penyangga berlubang yang telah berisi air. Penyulingan dilakukan di atas api sampai air mendidih. Uap air yang dihasilkan dialirkan pada pipa ke bagian kondensor dan mengalami kondensasi, bersama dengan uap air tersebut terbawa dengan minyak atsiri. Pemanasan dilakukan dengan api sampai penyulingan dihentikan setelah tidak ada penambahan minyak, kemudian tampung destilat dan ukur volume yang dihasilkan.

Minyak yang diperoleh kemudian dilakukan pemisahan fase air dan minyak menggunakan corong pisah dengan penambahan Na_2SO_4 anhidrat untuk memisahkan antara minyak dan air, seberat kurang dari 1% dari volume minyak atsiri sehingga didapat hasil sulingan minyak daun kemangi dan daun jeruk purut murni.

Minyak diperoleh kemudian disimpan dalam botol coklat dan di tempat yang sejuk, hal ini dilakukan untuk menghindari minyak atsiri yang didapat tidak rusak atau teroksidasi (Depkes 2003).

4. Analisis minyak atsiri

4.1 Pengamatan organoleptik. Pengamatan organoleptik terhadap minyak atsiri meliputi warna, aroma, bentuk dan rasa dari minyak. Warna minyak

atsiri hasil destilasi masing-masing sampel diambil dengan 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 kemangi dan daun jeruk purut memiliki bau aromatik, rasa membakar dan seperti rempah (Stahl 2008).

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

4.3 Penetapan indeks bias minyak atsiri. Pemeriksaan indeks bias, minyak atsiri dari daun kemangi dan daun jeruk purut diperiksa indeks bias dengan menggunakan refraktometer dengan cara sebagai berikut: badan prisma dibuka dan dibersihkan dengan kapas yang sudah dibasahi dengan alkohol. Mengatur refraktometer sehingga garis dan skala nampak jelas, mencatat temperatur ruang tempat bekerja dan kemudian meneteskan cairan yang diukur pada prisma dan menutup kembali. Pemutar sebelah kanan diputar sehingga batas gelap dan terang tepat pada satu garis silang kemudian membaca skala dan mencatat sebagai indeks bias.

4.4 Penetapan bobot jenis minyak atsiri. Bobot jenis minyak atsiri adalah perbandingan minyak atsiri dengan bobot air pada suhu dan volume yang sama. Penetapan bobot jenis dilakukan dengan cara menimbang botol piknometer memasukkan 1 mL minyak atsiri ke dalam botol piknometer tersebut, kemudian minyak atsiri dan botol timbang dengan teliti dan akurat lalu dibaca bobot jenis minyak atsiri tersebut. Penetapan bobot jenis dilakukan 3 kali pengulangan (Ansel 2006).

Penetapan bobot jenis minyak atsiri perlu ditentukan atau dihitung berat minyak atsiri dan berat air pada volume yang sama yaitu 1 mL. Penetapan berat minyak atsiri dan air ditetapkan dengan cara piknometer dikeringkan dengan cara dioven, kemudian ditimbang botol piknometer dan catat hasilnya. Ditimbang

masing-masing 1 mL minyak atsiri daun kemangi dan 1 mL minyak atsiri daun jeruk purut serta 1 mL air dimasukkan dalam masing-masing botol piknometer yang telah dicatat ditimbang. Botol piknometer yang berisi air dan minyak atsiri tersebut ditimbang, selanjutnya dicatat hasilnya.

Data hasil penimbangan botol piknometer dengan minyak atsiri serta botol piknometer dengan air dikurangkan dengan berat masing-masing botol piknometer kosong sehingga didapatkan berat minyak atsiri dan berat air, selanjutnya yaitu membandingkan atau membagi berat minyak atsiri dengan berat air dengan cara:

$$\text{Bobot jenis minyak atsiri} = \frac{\text{berat minyak atsiri}}{\text{berat air}}$$

4.5 Penetapan kelarutan dalam alkohol 70%. Menurut Badan Standar Nasional Indonesia (2001), uji kelarutan minyak atsiri dalam alkohol dilakukan dengan cara memipet minyak atsiri sebanyak 1 mL ke dalam gelas ukur 10 mL, ditambahkan alkohol 70% dengan cara bertahap, pada setiap penambahan alkohol dikocok dan diamati kejernihannya. Minyak atsiri yang larut dalam alkohol ditandai dengan larutan yang jernih dengan penambahan alkohol.

4.6 Karakterisasi komponen senyawa penyusun minyak atsiri dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Pengujian komponen senyawa penyusun minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut dilakukan di Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Pengujian komponen senyawa penyusun minyak atsiri menggunakan GC-MS Shimadzu GCMS-QP2010S (Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japan) dilengkapi dengan Capillary Column Model Number : Agilent 19091S-433 HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (diameter dalam 200 μm , panjang 30 m, dan ketebalan 0,25 μm) dan detector yang digunakan FID. Kondisi GC: suhu awal 60⁰C dinaikkan sampai 250⁰C (4⁰C/menit) kemudian pada suhu 250⁰C dipertahankan selama 20 menit, gas pembawa Helium dengan kecepatan aliran 20 mL/min. Senyawa diidentifikasi dengan membandingkan retention index

dan membandingkan masa spectra dengan yang ada di *database wiley library* dan *NIST library* (Adams 2004).

5. Sterilisasi

Sterilisasi media agar yang digunakan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit, medium tersebut lebih efektif sterilisasi dengan uap panas. Alat-alat yang terbuat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 170⁰C selama 2 jam. Alat-alat seperti *ose* disterilkan dengan cara dipijar atau dipanaskan langsung. Sterilisasi inkas dengan menggunakan formalin.

6. Pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 berdasarkan standar Mc Farland 0,5

Dilakukan pembuatan suspensi bakteri dengan mengambil biakan murni bakteri kurang lebih 2 ose. Suspensi dibuat dalam tabung yang berisi media BHI dan kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah 1,5x10⁸ CFU/mL. Tujuan disesuaikannya suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 dengan standar Mc Farland 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

7. Identifikasi bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

7.1 Identifikasi mikroskopis secara morfologi. Identifikasi khusus untuk bakteri *Staphylococcus epidermidis* dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri ini pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA). Dengan cara suspensi bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 yang telah siap diinokulasikan pada medium MSA kemudian diinkubasikan selama 24-48 jam dengan suhu 37⁰C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna medium di sekitar tetap merah. Media *Mannitol Salt Agar* (MSA) atau media *Vogel Johnson Agar* (VJA) merupakan media selektif dan diferensial. Media ini mendukung pertumbuhan bakteri dari grup tertentu. Media ini mengandung manitol yang merupakan suatu gula, dan garam (salt) dengan indikator pH yang digunakan adalah *phenol red*. Konsentrasi garam yang terkandung dalam media ini cukup tinggi, sehingga membuat media ini selektif terhadap bakteri *Staphylococcus*. Ciri khas dari bakteri *Staphylococcus* adalah bakteri ini tahan dengan kondisi kadar garam yang tinggi, sehingga pada

media *Mannitol Salt Agar* (MSA) dan media *Vogel Johnson Agar* (VJA) bakteri ini dapat tumbuh. Perbedaan antara *Staphylococcus epidermidis* dengan *Staphylococcus aureus* jika kedua jenis bakteri ini ditumbuhkan pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA) atau media *Vogel Johnson Agar* (VJA) adalah bakteri *Staphylococcus* akan memfermentasi manitol (gula) menjadi asam, perubahan pH akibat fermentasi manitol ini akan terdeteksi oleh indikator *phenol red* sehingga indikator mengalami perubahan warna yang semula berwarna merah berubah menjadi kuning. Berbeda halnya dengan bakteri *Staphylococcus epidermidis*, bakteri ini jika ditumbuhkan pada media MSA atau VJA tidak akan memfermentasi mannitol menjadi asam, sehingga indikator tidak akan mengalami perubahan warna (media tetap berwarna merah).

7.2 Identifikasi mikroorganisme dengan pewarnaan gram. Tujuan dari pewarnaan gram adalah untuk memastikan bakteri *Staphylococcus epidermidis* adalah bakteri gram positif. Pewarnaan Gram *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 menggunakan Gram A (cat Kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordan), Gram C (etanol : aseton = 1:1 sebagai peluntur), dan Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup). Pewarnaan gram dilakukan dengan cara membuat preparat ulas yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan Gram A sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Preparat selanjutnya dicuci dengan aquadestilata mengalir dan dikering anginkan. Preparat ditetesi Gram B diamkan selama kurang lebih 1 menit selanjutnya dicuci dengan aquadestilata mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan Gram C dan didiamkan selama kurang lebih 30 detik, cuci dengan aquadestilata mengalir kemudian ditetesi Gram D dan didiamkan selama kurang lebih 1 menit, cuci dengan aquadestilata mengalir kemudian keringkan preparat. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dinyatakan positif apabila berwarna ungu, berbentuk kokus.

7.3 Identifikasi *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 dengan uji biokimia. Identifikasi dengan uji biokimia ada dua cara yaitu dengan uji koagulase dan uji katalase. Uji koagulase dilakukan dengan cara plasma darah kelinci yang diberi sitrat, diencerkan dan dicampur dengan biakan kaldu sama

banyaknya dan direndam pada suhu 37⁰C. Suatu plasma dicampur dengan kaldu steril yang dieramkan sebagai kontrol. Tabung-tabung lain perlu sering diperiksa dengan melihat pembentukan massa 1-4 jam. Hasilnya positif kuat jika tabung test dibalik, gumpalan plasma tidak lepas dan tetap melekat pada dinding tabung. Sedangkan uji katalase dengan menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada medium nutrient cair dengan hidrogen peroksida 3% hasil dinyatakan positif bila terlihat pembentukan gelembung udara (Radji 2011).

8. Pengujian aktivitas antibakteri

8.1 Pengujian antibakteri secara difusi. Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Penelitian ini menggunakan cawan petri yang berisi MHA. Pertama bakteri diambil dari media BHI dengan menggunakan kapas lidi steril sebanyak satu kali kemudian dioleskan pada cawan petri yang berisi MHA 50 ml tersebut dan tunggu sampai bakteri berdifusi pada media. Kemudian secara aseptis pada cawan petri diulas suspensi bakteri menggunakan kapas lidi steril.

Setelah suspensi bakteri yang setara dengan standar Mc Farland 0,5 dioleskan dengan rata pada cawan petri yang berisi MHA, Kemudian pada setiap cakram berukuran 6 mm yang berisi kombinasi minyak atsiri (1:1), (1:2), (2:1), (1:3), (3:1) dengan cakram disk yang direndam selama 5 menit. Kontrol positif (+) cakram klindamisin dan kontrol negatif (-) cakram disk yang direndam aquadest steril. Setelah itu cakram diletakkan atau ditempelkan pada media MHA dengan menggunakan pinset, cawan petri diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Kemudian setelah 24 jam dilakukan inkubasi, zona hambat yang terbentuk dapat diukur. Pengukuran zona hambat disekitar cakram dilakukan menggunakan penggaris dengan ketelitian 1 mm. hasil dari pengukuran tersebut dijumlahkan dan dibagi dengan banyaknya pengukuran untuk mendapatkan besarnya zona hambat yang terbentuk.

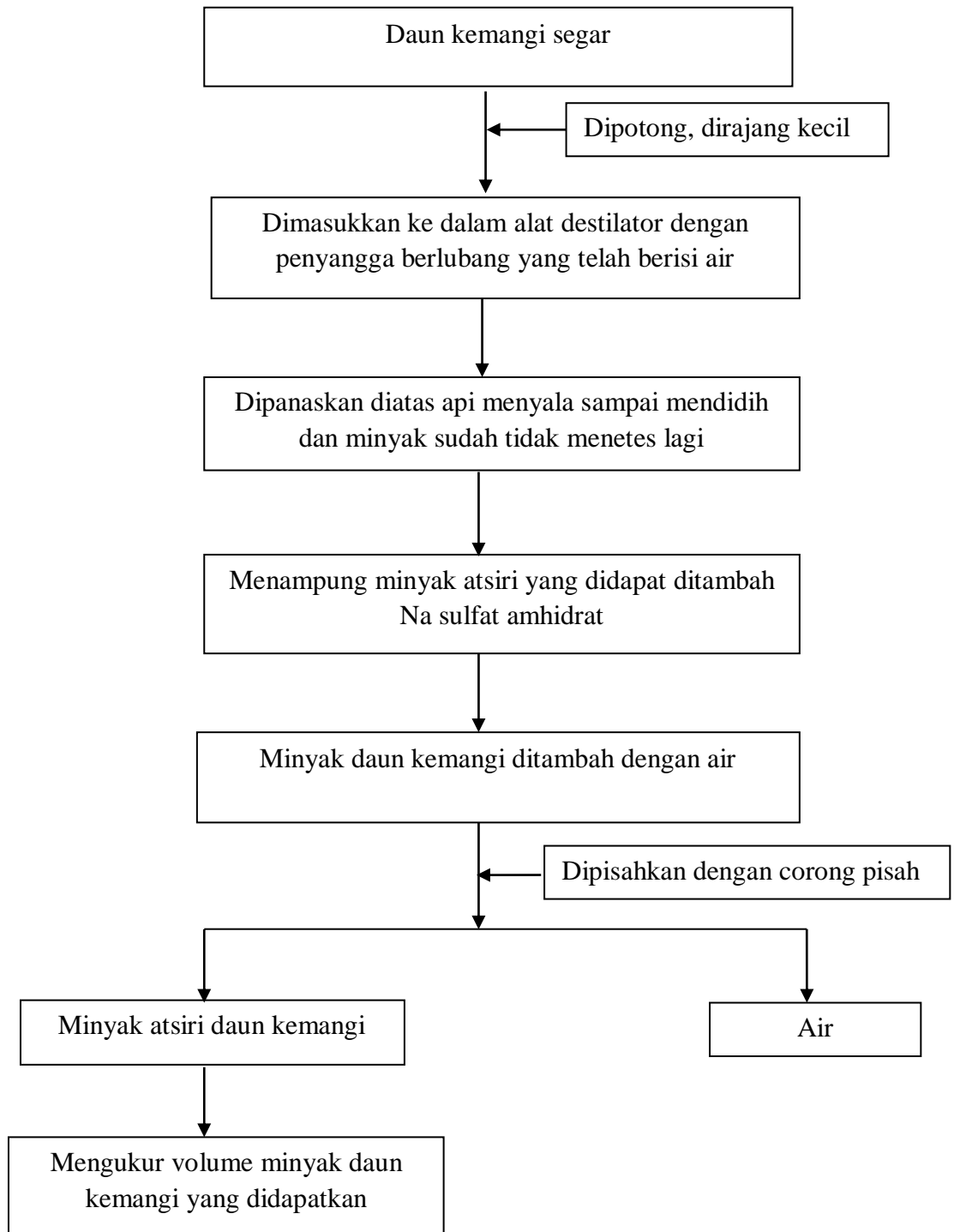
8.2 Pengujian antibakteri secara dilusi. Uji dilusi dilakukan untuk mengetahui KHM dan KBM minyak atsiri terhadap bakteri dengan konsentrasi. 8%, 4%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,13%, 0,06%, 0,03%, 0,02%. Metode dilusi dilakukan dengan cara pengenceran 12 tabung reaksi yang steril dan dibuat secara

aseptis. Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan bahan uji kedalam masing-masing tabung reaksi kecuali tabung nomor 12 sebagai kontrol positif yang berisi suspensi bakteri dan kontrol negatif yang berisi larutan kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut, masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa konsentrasi bahan uji yang berbeda dengan menambahkan bahan pengencer atau media BHI. Suspensi bakteri yang setara dengan standar Mc Farland 0,5 dimasukkan kedalam masing-masing tabung uji kecuali tabung nomor 1 sebagai kontrol negatif. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam, kemudian diamati kekeruhannya. Semua tabung uji dilakukan pengujian kembali untuk membuktikan apakah bakteri tersebut memang tidak dapat tumbuh dalam konsentrasi tersebut dengan menggunakan media NA untuk melihat pertumbuhan bakterinya dan untuk menentukan KHM dan KBM dari minyak atsiri tersebut.

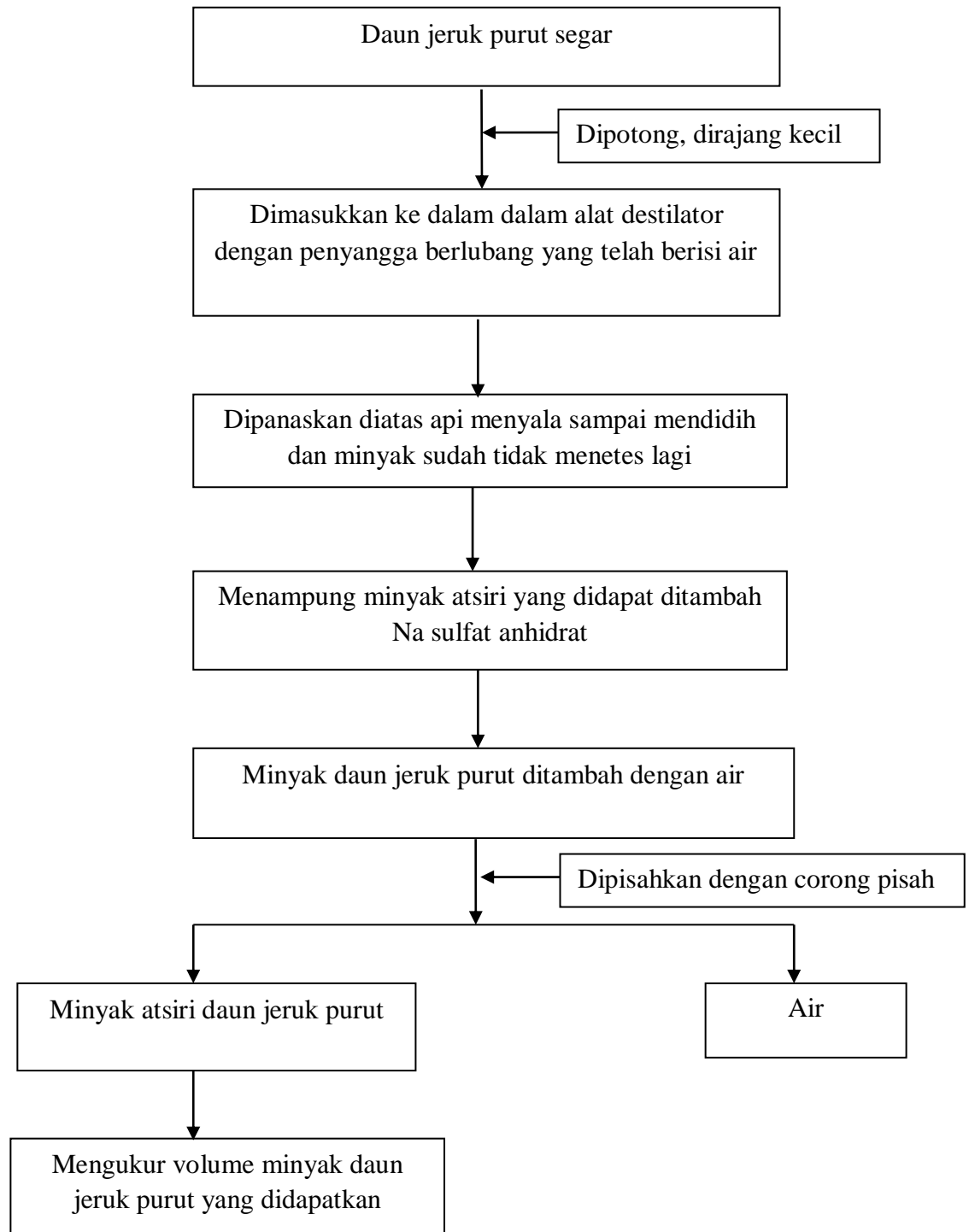
E. Analisis Hasil

Hasil penelitian diperoleh dengan mengukur daya sebar dilihat dari adanya daerah hambatan pertumbuhan bakteri uji yang ditunjukkan dengan adanya zona jernih di sekeliling cakram yang tidak ditumbuhi bakteri, kemudian diukur diameter hambatan pertumbuhan bakterinya dari masing-masing lingkaran. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *Kolmogorof-Smirnov*, jika terdistribusi secara normal kemudian dilanjutkan dengan *Analysis Of Variance* (ANOVA) dua jalan.

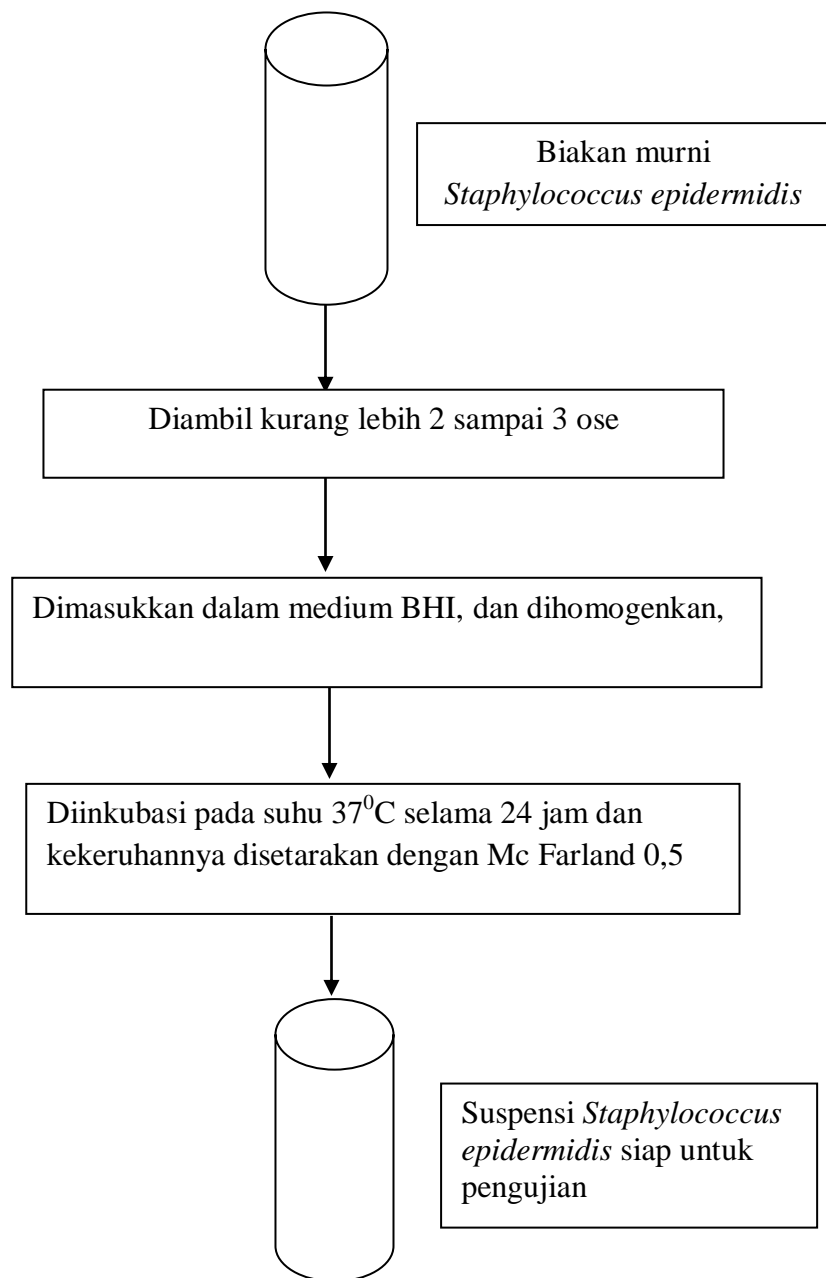
Analisis hasil yang digunakan pada metode dilusi adalah dengan melihat pertumbuhan bakteri *Satphylococcus epidermidis* ATCC 12228 pada tabung reaksi. KHM ditentukan berdasarkan hasil pengamatan dimana konsentrasi terkecil yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. KBM ditentukan berdasarkan hasil pengamatan, dimana konsentrasi terkecil yang tidak ada pertumbuhan ditentukan sebagai KBM.



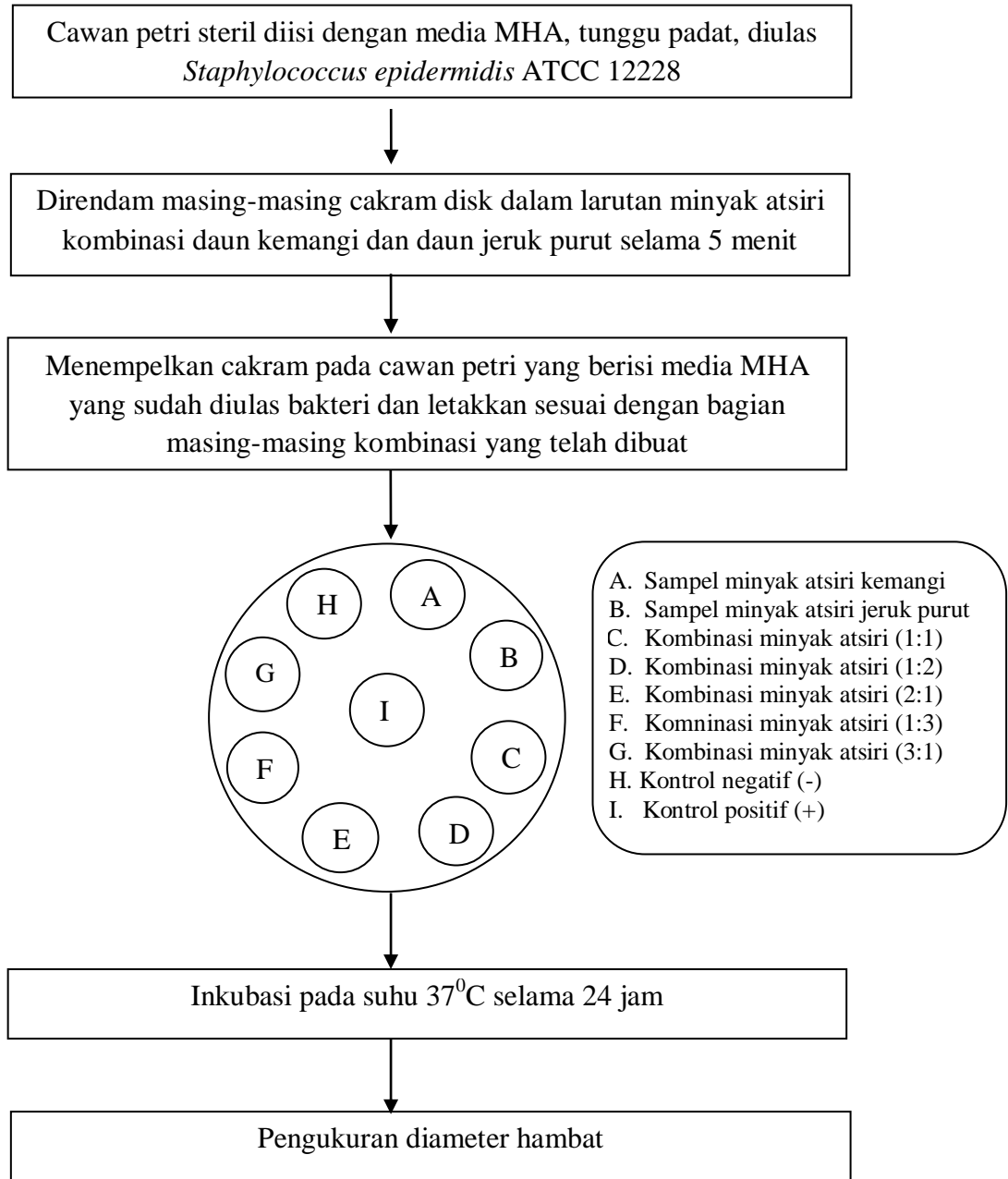
Gambar 4. Skema isolasi minyak atsiri daun kemangi



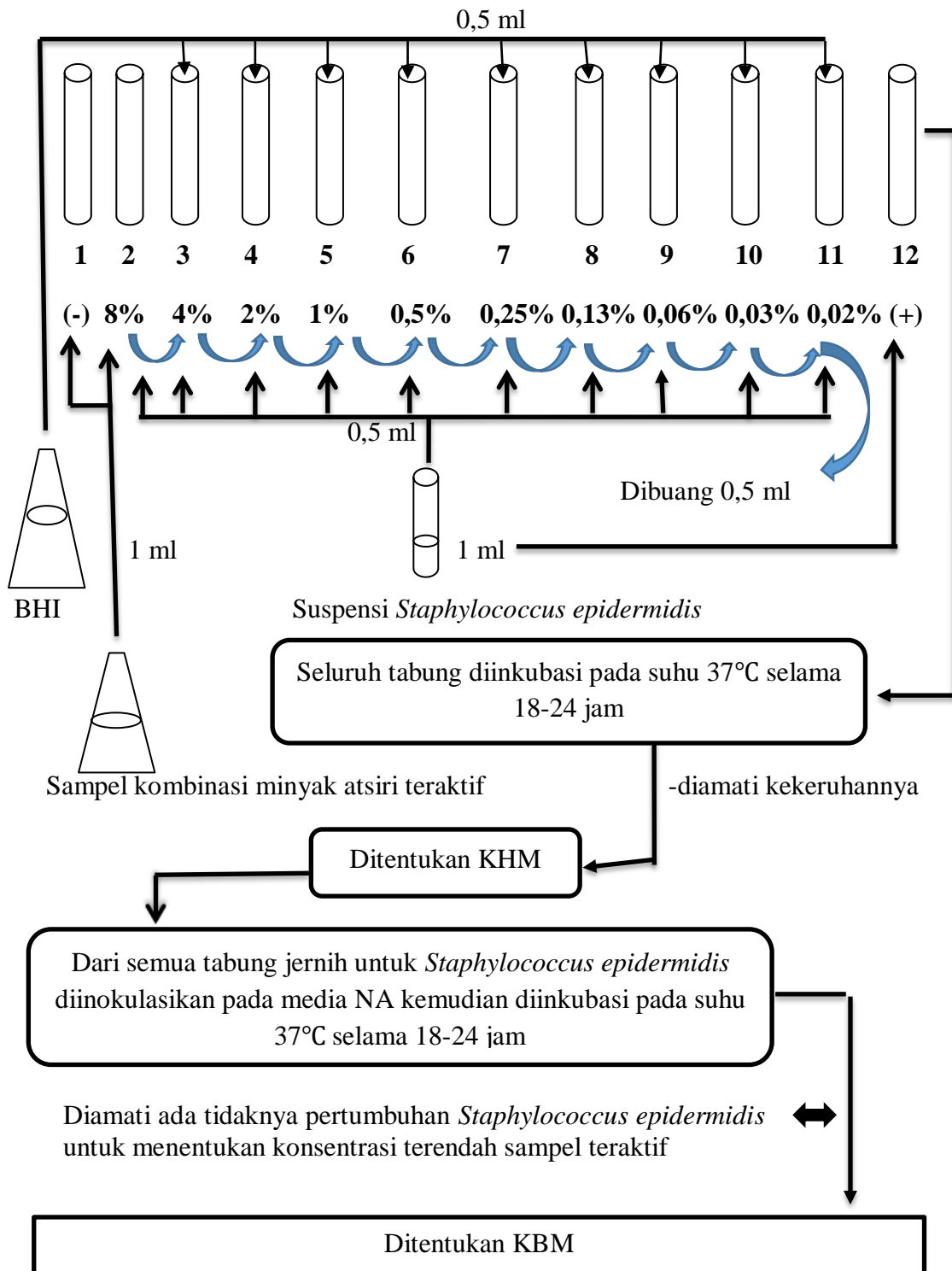
Gambar 5. Skema isolasi minyak atsiri daun jeruk purut



Gambar 6. Skema pembuatan suspensi *Staphylococcus epidermidis*



Gambar 7. Skema pengujian aktivitas antibakteri secara difusi



Gambar 8. Skema pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi