

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

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 Kebonallas, kecamatan Manisrenggo, kabupaten Klaten, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) segar berwarna hijau, bebas dari penyakit, serta bersih dan diambil secara acak dari desa Kebonallas, kecamatan Manisrenggo, kabupaten Klaten, Jawa Tengah

B. Variabel Bebas

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah minyak atsiri dari daun kemangi dan daun jeruk purut, beserta kombinasinya.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut.

Variabel utama ketiga penelitian ini adalah aktivitas antibakteri minyak atsiri dari daun kemangi dan daun jeruk purut beserta kombinasinya terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

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 sedang pengertian

variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan pengaruh selain variabel bebas.

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

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah minyak atsiri daun kemangi, minyak atsiri daun jeruk purut, bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, sterilisasi, suhu, kondisi peneliti, kondisi laboratorium, media dan metode penelitian.

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

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun yang digunakan adalah daun kemangi yang berwarna hijau, segar, sehat, dan bebas dari hama. Daun kemangi diambil secara acak dari Klaten, Jawa Tengah.

Kedua, daun jeruk purut yang digunakan adalah daun jeruk purut yang berwarna hijau, segar, sehat, dan bebas dari hama. Daun jeruk purut diambil secara acak dari Klaten, Jawa Tengah.

Ketiga, minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut adalah minyak atsiri hasil destilasi dengan menggunakan metode destilasi uap air.

Keempat, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kelima, 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 jeruk purut dan satu bagian minyak atsiri daun kemangi.

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

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

Kedelapan, kontrol positif adalah cakram disk ciprofloxacin dengan dosis 5 µg mampu menghambat pertumbuhan bakteri dalam media uji.

Kesembilan, kontrol negatif adalah cakram disk yang berisi aquadest steril.

Kesepuluh, uji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun kemangi, daun jeruk purut beserta kombinasinya adalah pengujian aktivitas dengan menggunakan metode difusi untuk melihat pertumbuhan bakteri dalam media uji dengan konsentrasi 2% dan 4%.

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 spiritus, jarum ose tangkai panjang, cawan petri steril, kapas lidi steril, inkubator, cakram ukuran 6 mm, mikropipet, autovortex mixer, gelas ukur, pipet volume steril, botol vial steril, inkas, autoklaf, oven, pinset, neraca analitik dan penggaris. Alat untuk analisis minyak atsiri yaitu refraktometer dan GCMC-QP2010S.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam uji mikrobiologi antibakteri adalah minyak atsiri dari daun kemangi dan daun jeruk purut dengan konsentrasi 2% dan 4% untuk uji difusi.

Bahan kimia yang digunakan adalah Na sulfat eksikatus, Tween80 1%, H₂O, dan cakram disk antibiotik. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mueler Hilnton Agar* (MHA), *Endo Agar* (EA), *Brain Heart Infusion* (BHI).

Penelitian ini menggunakan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama pada penelitian ini yaitu menetapkan kebenaran sampel daun kemangi dan daun jeruk purut yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada daun kemangi dan daun jeruk purut sesuai dengan kepustakaan dan dibuktikan dibagian Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Pengambilan bahan

Daun kemangi diperoleh dari Klaten, Jawa Tengah, dan daun jeruk purut diperoleh dari Klaten, Jawa Tengah. Kemangi dan Jeruk purut yang diambil adalah bagian daunnya yang berwarna hijau, lalu dibersihkan dari kotoran yang menempel. Sebelum diproses, dirajang dahulu menjadi potongan-potongan kecil.

3. Isolasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut

Isolasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut dilakukan dengan metode uap-air. Daun kemangi dan daun jeruk purut dalam kondisi segar dipotong dengan ukuran ± 1 cm dan dimasukkan kedalam alat penyulingan minyak dan air yang menyerupai dandang dengan penyangga berlubang yang telah berisi air. Penyulingan dilakukan di atas api selama $\pm 5-7$ atau 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. Penyulingan dihentikan bila minyak atsiri tidak ada penambahan, kemudian destilat ditampung dan diukur volume minyak atsiri diperoleh. Minyak atsiri yang diperoleh dilakukan pemisahan fase air dan minyak menggunakan corong pisah dengan ditambahkan Na_2SO_4 eksikator yang berfungsi untuk memisahkan antara fase air dan fase minyak, seberat kurang dari 1% dari volume minyak atsiri sehingga didapatkan hasil sulingan minyak daun kemangi dan daun jeruk purut murni. Minyak atsiri yang diperoleh disimpan pada botol gelap (coklat) dan tertutup rapat dan terlindungi dari cahaya langsung (Depkes 2003).

4. Analisis minyak atsiri

4.1 Pengamatan organoleptik. Pengamatan organoleptik terhadap minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut meliputi warna, aroma, bentuk,

dan rasa dari minyak. Warna minyak atsiri hasil destilasi masing-masing sampel diambil volume yang sama dan ditempatkan dalam sebuah wadah berbahan kaca yang bersih dan jernih. Bau dan rasa minyak atsiri memiliki bau dan rasa minyak atsiri memiliki bau dan rasa yang khas sesuai dari tanaman asalnya. Organoleptik minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut.

4.2 Identifikasi minyak atsiri. Identifikasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) dengan kertas saring.

Pertama, minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) ditetaskan pada kertas saring yang telah disiapkan kemudian dilihat jika dibiarkan minyak atsiri akan menguap sempurna dan tidak meninggalkan bekas noda lemak.

Kedua, minyak atsiri daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) ditetaskan pada kertas saring yang telah disiapkan kemudian dilihat jika dibiarkan minyak atsiri akan menguap sempurna dan tidak meninggalkan bekas noda lemak.

Ketiga, minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) dilakukan secara tunggal masing-masing ditambah sudan II maka akan berubah menjadi warna merah kemudian ditetaskan dalam permukaan air maka akan menyebar diatas permukaan air tersebut.

4.3 Penetapan indeks bias minyak atsiri. Minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC.) diperiksa indeks bias dengan satu kali pengulangan menggunakan refraktometer dengan cara sebagai berikut badan prisma dibuka dan kemudian dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol. Refraktometer diatur sehingga garis dan skala tampak jelas, mencatat suhu ruang tempat bekerja kemudian meneteskan cairan yang diukur pada prisma dan kemudian ditutup kembali. Pemutar sebelah kanan diatur sehingga batas gelap dan terang tepat pada garis dan dibaca skala dicatat indeks biasnya (Irwan 2009).

4.4 Penetapan bobot jenis minyak atsiri. Penetapan bobot jenis ditetapkan dengan cara piknometer dibersihkan dan dikeringkan pada oven, kemudian piknometer kosong ditimbang dan dicatat beratnya. Piknometer diisi

akuades kemudian ditimbang dan catat beratnya. Bobot jenis minyak atsiri adalah perbandingan antara bobot jenis minyak atsiri dengan bobot jenis air pada suhu dan volume yang sama.

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

4.5 Penetapan kelarutan dalam alkohol. Menurut BSNI (2006), uji kelarutan minyak atsiri dalam alkohol dilakukan dengan cara memipet minyak sebanyak 1 ml ke dalam gelas ukur 10 ml, ditambahkan alkohol 70% dengan cara bertahap. Setiap penambahan alkohol kocok dan amati kejernihannya.

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 menggunakan GC-MS Shimadzu GCMS-QP2010S (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) Shimadzu GCMS-QP2010S (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) dilengkapi dengan Capillary Column Model Number: Agilent 19091S-433 HP-5MS 5 % Phenyl Methyl Siloxane (diameter dalam 250 μm , panjang 30 m, dan ketebalan film 0.25 μm) dan detektor yang digunakan FID. Kondisi GC: suhu awal 60 $^{\circ}\text{C}$ dinaikkan sampai 250 $^{\circ}\text{C}$ (4 $^{\circ}\text{C}/\text{menit}$) kemudian pada suhu 250 $^{\circ}\text{C}$ dipertahankan selama 20 menit, gas pembawa Helium dengan kecepatan aliran 20 ml/min. Senyawa diidentifikasi dengan membandingkan retention index dan membandingkan mass spectra dengan yang ada di database *wiley library* dan *NIST library* (Adams 2004).

5. Sterilisasi alat dan bahan

Media agar yang digunakan dapat disterilisasikan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121 $^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit dengan tekanan 2-4 atm, karena uap panasnya efektif untuk sterilisasi medium. Alat-alat dengan gelas ukur disterilisasikan dengan menggunakan oven pada suhu 170 $^{\circ}\text{C}$ - 180 $^{\circ}\text{C}$ selama 1 Jam. Alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanas api. Sterilisasi inkas menggunakan formalin.

6. Pembuatan suspensi metode McFarland 0,5 uji bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Biakan murni bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 ditanam pada media NA. Pembuatan suspensi dilakukan dengan mengambil biakan murni kurang lebih 1 ose bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Suspensi dibuat dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Tujuan disesuaikannya suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan standar Mc Farland 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

7. Identifikasi bakteri *Escherichia coli*

7.1 Identifikasi berdasarkan koloni. Suspensi bakteri diinokulasi pada media *Endo Agar* (EA) diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif dikatakan bila penampakan koloni merah dengan logam kilau yang permanen dan warna medium merah violet (Volk & Wheller 1988).

7.2 Identifikasi mikroskopis secara morfologi. Pewarnaan Gram untuk memastikan bahwa bakteri tersebut golongan Gram Negatif. Suspensi bakteri *Escherichia coli* diambil dari media biakan menggunakan jarum ose yang telah dipijarkan, lalu diratakan di atas *object glass*. Larutkan zat warna kristal violet diteteskan sebanyak 2 sampai 3 tetes dan didiamkan selama 3 menit. Preparat diberikan aquades mengalir dan dikeringkan. Larutan lugol diteteskan dan dibiarkan selama 1 menit, lalu di cuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan alkohol diberikan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan safranin diberikan selama 3 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Minyak imersi diberikan diatas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x100 kali. Pewarnaan dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri tersebut golongan *Escherichia coli*. Bakteri Gram negatif golongan *Escherichia coli* bila sel bakteri berwarna merah, bentuk bacilli.

7.3 Identifikasi *Escherichia coli* dengan uji biokimia

7.3.1 Media SIM (*Sulfide Indol Motilitas*). Biakan murni bakteri diinokulasi pada permukaan media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji sulphide, indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif bila berwarna hitam. Uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah reagen Ehrlich. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media.

7.3.2 Media KIA (*Klinger Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada bagian lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas yang ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+).

7.3.3 Media LIA (*Lisin Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi lisin dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna coklat (ditulis R). Berwarna ungu yang berarti suasananya basa (ditulis K), berwarna kuning yang berarti suasananya asam (ditulis A) disertai terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+).

7.3.4 Media Sitrat. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Uji ini positif bila media berwarna biru.

8. Pengujian antibakteri

Metode yang digunakan untuk uji daya hambat antibakteri adalah metode difusi. Metode difusi digunakan untuk mengetahui adanya daya hambat terhadap

bakteri uji dan untuk menentukan diameter daerah hambat dari minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut dengan konsentrasi 2% dan 4%. 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 tersebut dan tunggu sampai bakteri berdifusi pada media.

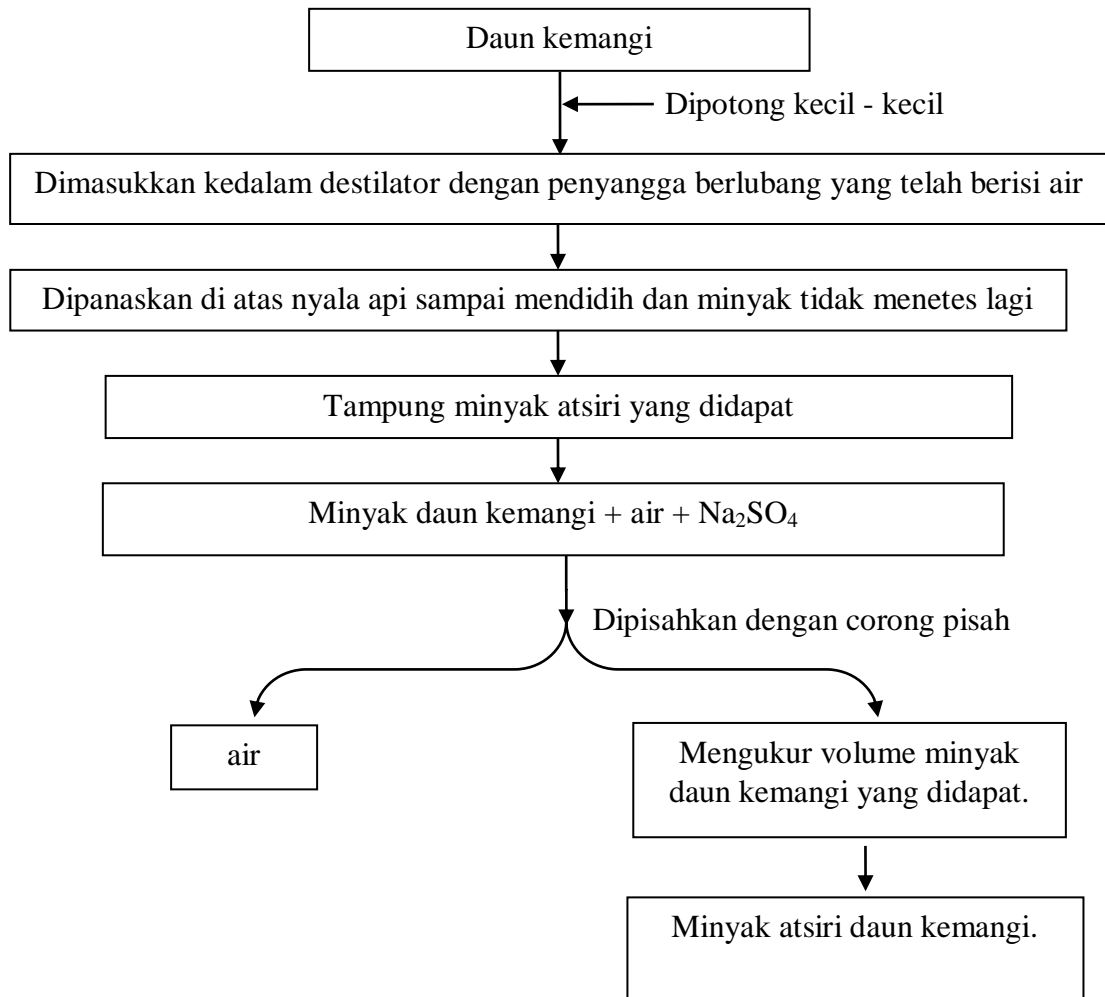
Setelah suspensi bakteri diratakan pada MHA, kemudian pada setiap cakram yang berukuran 6 mm direndam selama 10 menit pada minyak atsiri dengan larutan kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut yang sudah ditambahkan aquadest dan Tween80 1% sebagai emulgator. Pada cakram pertama berisi sampel minyak atsiri daun kemangi, cakram kedua berisi sampel daun jeruk purut. Kemudian pada cakram ketiga hingga ketujuh berisi kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan minyak atsiri daun jeruk purut dengan perbandingan variasi kombinasi 1:1, 1:2, 2:1. Kontrol positif menggunakan cakram disk Ciprofoxacin. Kontrol negatif yang digunakan adalah cakram disk yang berisi aquadest steril. Cakram diletakkan atau ditempelkan pada media MHA dengan menggunakan pinset, kemudian cawan petri diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona hambat yang terbentuk dapat diukur.

Pengukuran zona hambat yang terbentuk dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam di sekitar cakram menggunakan penggaris dengan ketelitian 1 mm. Hasil dari pengukuran tersebut dijumlahkan dan dibagi dengan banyaknya pengukuran untuk mendapatkan besarnya zona hambat yang terbentuk.

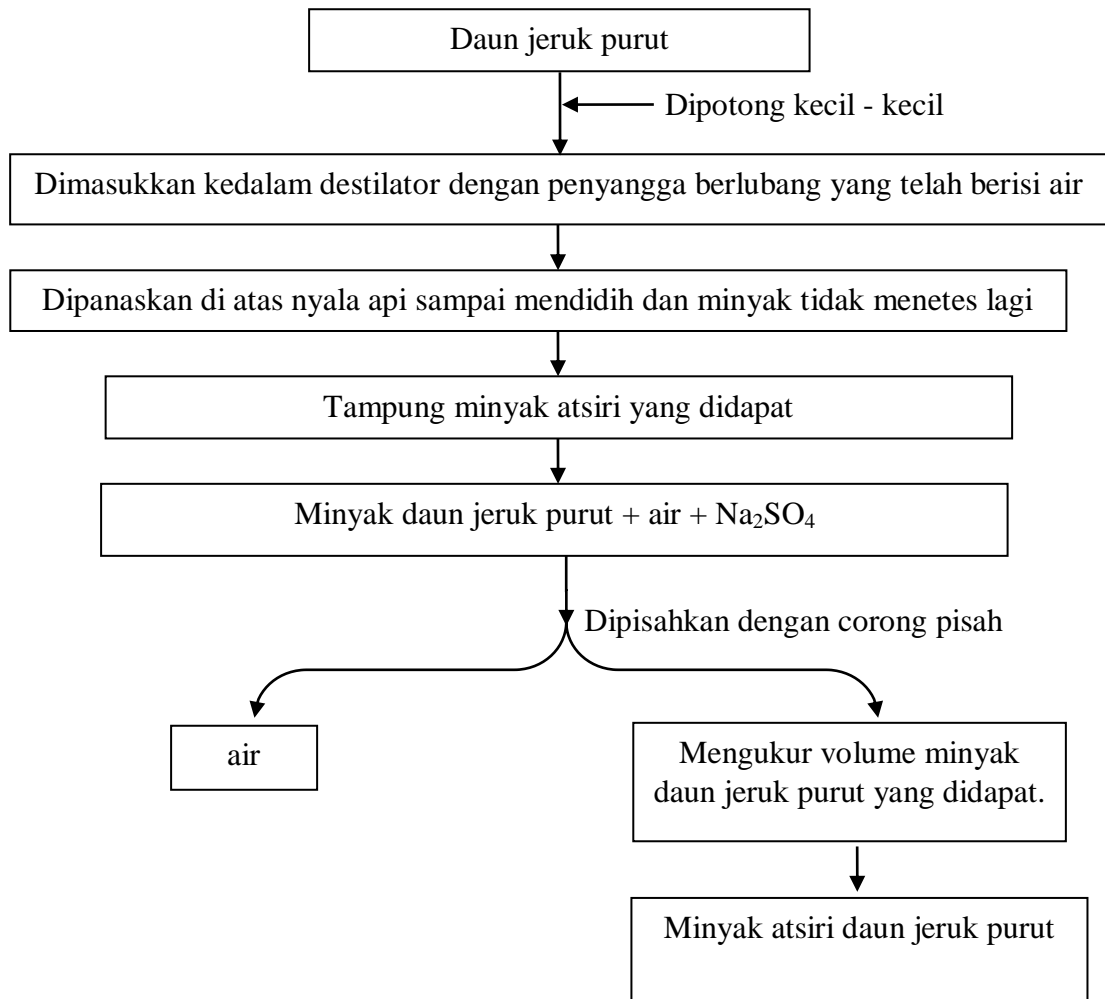
E. Analisis Hasil

Hasil penelitian dianalisis berdasarkan kombinasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) yang telah diuji dengan pengujian antibakteri yang dilihat dengan daya hambat bakteri terhadap kombinasi minyak atsiri. Analisa data untuk membandingkan minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Data yang diperoleh dianalisa

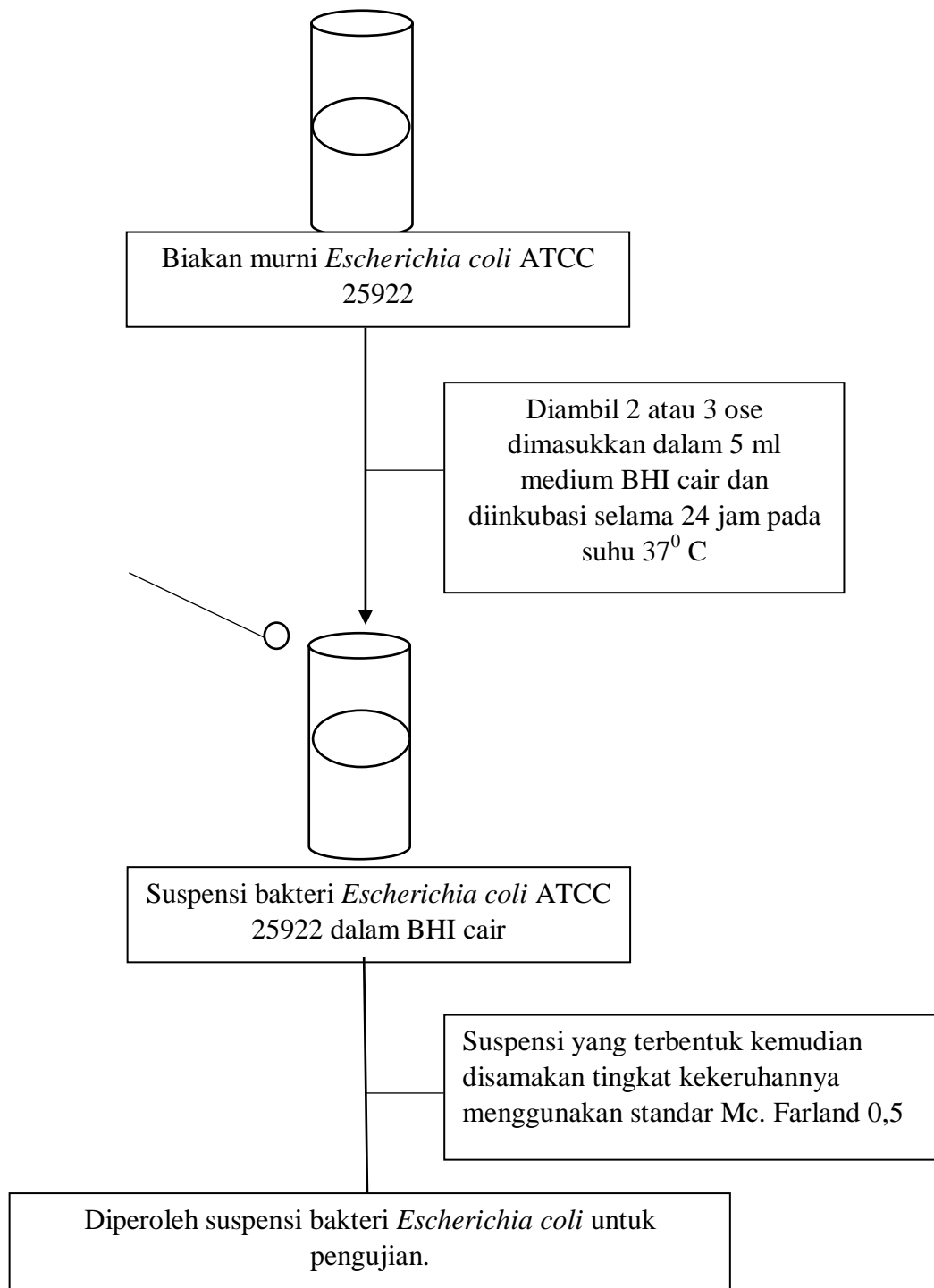
menggunakan *Kolmogorof-Smirnov*, jika terdistribusi secara normal kemudian dilanjutkan dengan *analysis of varian* (ANOVA) dua jalan.



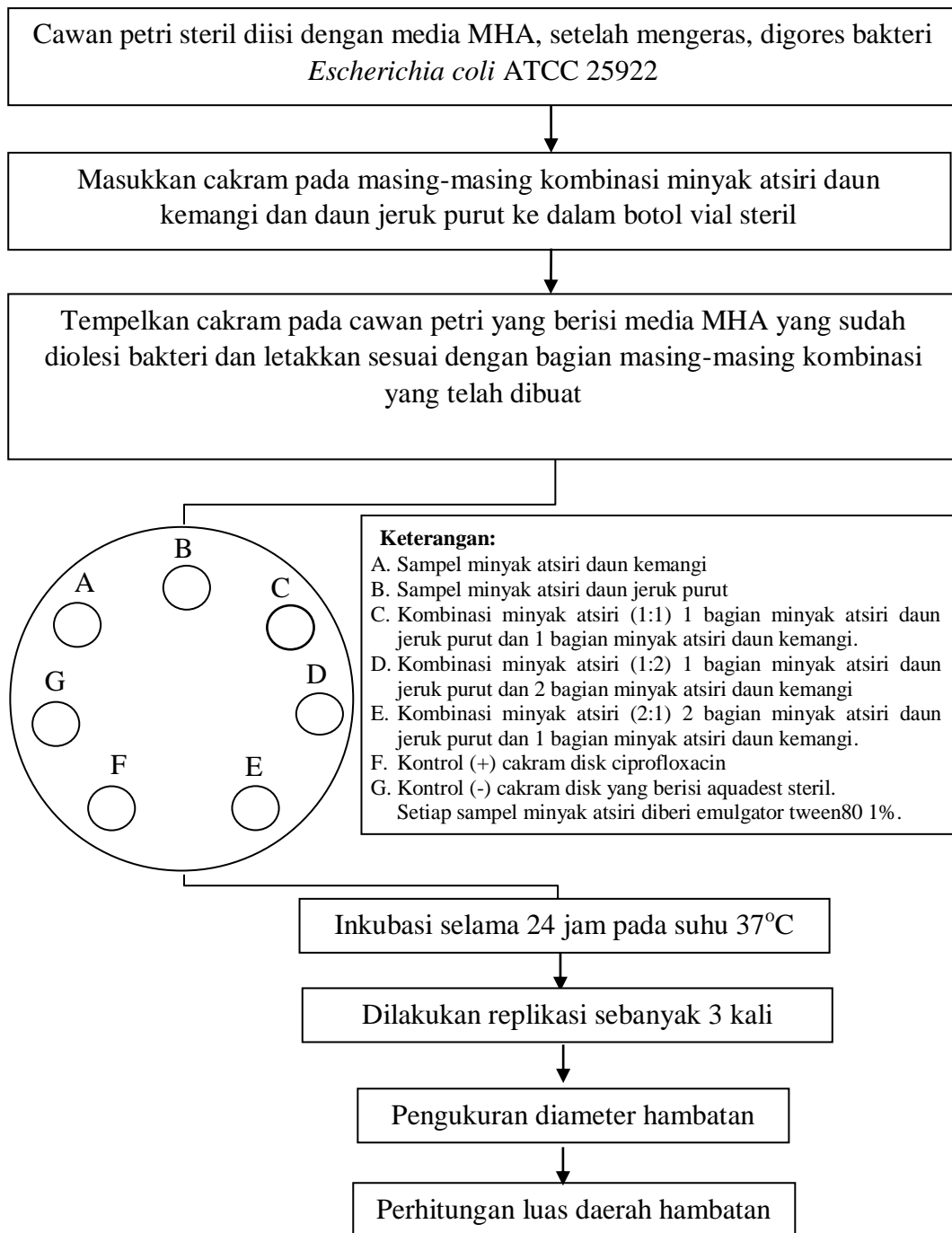
Gambar 4. Skema isolasi minyak atsiri daun kemangi



Gambar 5. Skema isolasi minyak atsiri daun jeruk purut



Gambar 6. Skema pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25923



Gambar 7. Skema pengujian aktivitas antibakteri secara difusi