

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D. C.) yang diambil di desa Kebon Alas, Kecamatan Manisrenggo, Kabupaten Klaten, Provinsi Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi dan daun jeruk purut segar berwarna hijau, bersih dan wangi, serta bebas dari penyakit yang diambil secara acak di desa Kebon Alas, Kecamatan Manisrenggo, Kabupaten Klaten, Provinsi Jawa Tengah, yang diambil pada waktu pagi hari sebelum terjadinya fotosintesis.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

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

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

Variabel utama ketiga dari penelitian ini adalah aktivitas antibakteri minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut serta kombinasinya terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel meliputi variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini

adalah kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut dengan berbagai konsentrasi atau kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut diuji antibakteri dengan berbagai konsentrasi.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175, kondisi laboratorium (meliputi kondisi inkubasi, alat dan bahan yang digunakan harus steril) dan media yang digunakan dalam penelitian harus steril.

Variabel terikat adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah konsentrasi sampel minyak atsiri dan perbandingan kombinasi antara minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut yang digunakan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, minyak atsiri merupakan zat berbau yang terkandung dalam tanaman yang memiliki sifat mudah menguap.

Kedua, daun kemangi mengandung minyak atsiri eugenol yang diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

Ketiga, daun jeruk purut mengandung minyak atsiri 1-1,5%; steroid; triterpenoid; dan tanin 1,8%. Minyak atsiri daun jeruk purut diketahui memiliki kemampuan antibakteri.

Keempat, kombinasi obat adalah penggunaan campuran dua atau lebih obat berbeda yang akan berada didalam darah secara bersamaan.

Kelima, destilasi uap air merupakan penyulingan yang dapat menghasilkan uap basah, jenuh dan tidak terlalu panas. Bahan tanaman yang akan disuling hanya berhubungan dengan uap dan tidak dengan air panas.

Keenam, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang menjadi penyebab timbulnya karies gigi. Bakteri uji diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Ketujuh, metode difusi adalah uji aktivitas antibakteri dengan konsentrasi 2% dan 4%. Metode difusi menggunakan media MHA dalam cawan petri yang mempunyai diameter dan ketebalan tertentu. MHA diratakan dipermukaannya

dengan suspensi bakteri uji sampai rata kemudian meletakkan cakram yang telah diisi kombinasi minyak atsiri (1:1), (1:2), (2:1), (1:3), (3:1) yang telah diberi tween 80 1% sebagai emulgator. Cakram disk yang direndam selama 2-5 menit. Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Mengamati dan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat untuk pembuatan minyak atsiri berupa kondensor dan dandang besar. Peralatan untuk uji mikrobiologi berupa inkubator, inkas, jarum ose, kapas lidi, cawan petri, pipet volume, pipet tetes, pipet ukur, lampu spiritus, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, cakram berukuran 6 mm, mikropipet, autovortex mixer, oven, gelas ukur, erlenmeyer, autoklav, neraca analitik, botol vial dan penggaris. Gambar alat penelitian dapat dilihat pada lampiran 4.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam uji mikrobiologi adalah penelitian ini adalah minyak atsiri daun kemangi dan minyak atsiri daun jeruk purut dengan konsentrasi 2% dan 4%.

Bahan kimia yang digunakan antara lain eritromisin, tween 80, Na₂SO₄ anhidrat. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium *Muller Hinton Agar* (MHA), medium *Brain Heart Infusion Both* (BHIB), medium *Manitol Salt Agar* (MSA), dan medium agar darah.

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang diperoleh dari Laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta (USB).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap awal dalam penelitian ini adalah determinasi tanaman yang akan digunakan dalam penelitian, yaitu tanaman kemangi dan tanaman jeruk purut.

Determinasi dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta. Determinasi dilakukan dengan tujuan untuk menetapkan keberadaan yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang dilakukan secara makroskopi tanaman kemangi dan tanaman jeruk purut terhadap kepustakaan yang dibuktikan di laboratorium. Gambar hasil determinasi tanaman kemangi dan tanaman jeruk purut dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Isolasi minyak atsiri

Metode isolasi yang paling lazim digunakan adalah metode destilasi. Metode destilasi meliputi metode destilasi air, metode destilasi uap air serta metode destilasi uap langsung. Penelitian ini menggunakan metode destilasi uap air untuk mengisolasi minyak atsiri yang ada pada daun kemangi dan daun jeruk purut. Daun kemangi dan daun jeruk purut yang telah dipotong masing – masing dimasukkan ke dalam alat penyulingan minyak atsiri dan air yang menyerupai dandang dengan penyangga berlubang, kemudian di isi dengan air sampai permukaannya tidak jauh bagian bawah saringan. penyulingan dihentikan tidak ada penambahan minyak, kemudian tampung destilat. Destilat dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian tambahkan Na_2SO_4 anhidrat. Minyak atsiri ditampung dan ukur volume yang dihasilkan (Gunawan dan Mulyani 2004). Gambar skema isolasi minyak atsiri dapat dilihat pada gambar 4 dan 5.

3. Analisa minyak atsiri

3.1 Pengamatan organoleptik. Pengamatan organoleptik terhadap minyak atsiri meliputi warna, rasa, bau dan bentuk dari minyak atsiri. Pengujian warna minyak atsiri hasil destilasi dilakukan dengan menempatkan minyak atsiri masing-masing sampel pada sebuah kaca bersih dan jernih. Minyak atsiri memiliki rasa dan bau yang khas sesuai tanaman asalnya. Organoleptik dari minyak atsiri daun kemangi dan jeruk purut memiliki bau aromatik, rasa membakar dan seperti rempah (Stahl 2008).

3.2 Identifikasi minyak atsiri. Minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut diidentifikasi dengan meneteskan minyak atsiri di permukaan air, minyak atsiri diberi sudan II kemudian ditetaskan pada permukaan air maka akan menyebar dan permukaan tidak keruh. Minyak atsiri ditetaskan pada kertas saring,

jika dibiarkan minyak akan menguap sempurna tanpa meninggalkan bekas noda lemak (Gunawan dan Mulyani 2004).

3.3 Penetapan indeks bias. Penetapan indeks bias bertujuan untuk mengetahui kemurnian dari minyak atsiri yang didapat. Pengujian ini dilakukan dengan alat refraktometer dengan cara membuka badan prisma kemudian dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi alkohol. Refraktometer diatur sehingga garis dan skala tampak jelas, mencatat suhu ruang tempat bekerja kemudian meneteskan minyak atsiri yang diukur pada prisma dan tutup kembali. Pemutar sebelah kanan diatur sehingga batas gelap dan terang pada garis, dibaca skalanya dan catat indeks bias yang diperoleh (Stahl 2008).

3.4 Penetapan bobot jenis minyak atsiri, dilakukan untuk mempermudah dalam memformulasi obat. Karena dengan mengetahui bobot jenisnya maka kita dapat menentukan apakah suatu zat dapat bercampur atau tidak dengan zat lainnya. Pengujian dilakukan dengan membersihkan piknometer menggunakan etanol dan dietil eter kemudian bagian dalam piknometer dikeringkan dan ditutup, menimbang piknometer kosong (m). Air suling dimasukkan dalam piknometer sambil menghindari adanya gelembung udara, kemudian ditutup dan dikeringkan bagian luar piknometer lalu ditimbang (m_1). Piknometer dikosongkan kemudian dibersihkan menggunakan etanol dan dietil eter lalu dikeringkan, sampel minyak atsiri dimasukkan sambil menghindari adanya gelembung udara, kemudian ditutup dan dikeringkan bagian luar piknometer lalu ditimbang (m_2). Bobot jenis minyak atsiri adalah perbandingan antara bobot minyak atsiri dan bobot air pada suhu dan volume yang sama (BSNI 2006).

3.5 Penetapan kelarutan dalam etanol. Kelarutan dalam etanol merupakan nilai perbandingan banyaknya minyak atsiri yang larut sempurna dengan pelarut etanol. Setiap minyak atsiri mempunyai nilai kelarutan dalam etanol yang spesifik, sehingga sifat ini bisa digunakan untuk menentukan suatu kemurnian minyak atsiri. Uji kelarutan minyak atsiri dalam etanol dilakukan dengan cara memipet minyak atsiri sebanyak sebanyak 1 mL ke dalam gelas ukur

10 mL, ditambahkan etanol 70% secara bertahap, pada setiap penambahan etanol, kocok dan amati kejernihannya (BSNI 2006).

3.6 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 GC-MS-QP2010S (Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japan) yang dilengkapi dengan Capillary Column Model Number : Agilent 19091S-433 HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (diameter dalam 200 μ m, panjang 30 m, dan ketebalan 0,25 μ m) dan detektor yang digunakan FID. Kondisi GC : suhu awal 60 °C dinaikan sampai 250 °C (4 °C/menit) kemudian pada suhu 250 °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 dkk 2004).

4. Sterilisasi

Media dan alat yang akan digunakan dalam penelitian ini harus disterilkan terlebih dahulu. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat – alat yang terbuat dari kaca seperti gelas ukur dan beker glass disterilisasi dengan oven pada suhu 170-180°C selama 2 jam. Jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung dan inkas disterilkan dengan formalin (Suriawira 2005).

5. Pembuatan suspensi bakteri uji *Streptococcus mutans*

Pembuatan suspensi bakteri untuk uji difusi dilakukan dengan mengambil biakan murni kurang lebih 2-3 ose bakteri *Streptococcus mutans* kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI). Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian kekeruhan suspensi bakteri disesuaikan dengan larutan Mc Farland 0,5 yang setara dengan jumlah $1,5 \times 10^8$ cfu/mL (CLSI 2012). Tujuan disesuaikannya suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dengan media standar Mc Farland 0,5 agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian (Haris dkk 2013).

Skema pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dapat dilihat pada gambar 6.

6. Identifikasi bakteri *Streptococcus mutans*

6.1 Identifikasi mikroskopis secara morfologi. Identifikasi morfologi bakteri dilakukan dengan pewarnaan Gram dilakukan dengan membuat preparat ulas yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan. Preparat ditetesi larutan lugol kemudian didiamkan selama 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan, langkah selanjutnya preparat ditetesi dengan safranin didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Minyak imersi ditetaskan pada preparat, kemudian diperiksa dibawah mikroskop pada perbesaran 100x10 kali. Bakteri yang tetap berwarna ungu meskipun disertai pewarna oleh zat warna kontras merupakan bakteri Gram positif. Sedangkan bakteri yang setelah didekolorisasi dengan alkohol akan menjadi tidak berwarna dan bila diberikan pewarnaan dengan warna kontras akan berubah sesuai dengan zat warna kontras (merah muda), bakteri tersebut merupakan bakteri Gram negatif (Fatimawali, 2016).

6.2 Uji biokimia. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dari kultur murni kemudian ditusukkan pada media MSA (*Manitol Salt Agar*) dan dikultur pada media agar darah. Media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil identifikasi *Streptococcus mutans* menunjukkan perubahan warna dari merah menjadi kuning. Uji *Streptococcus mutans* pada media agar darah menunjukkan hemolisis pada sel darah merah. *Streptococcus mutans* mempunyai tipe α -hemolitik yaitu melisis sel darah merah secara parsial akibat reduksi hemoglobin sehingga memperlihatkan warna kehijauan disekitar koloni (Radji 2011).

6.3 Uji katalase. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengoleskan biakan murni *Streptococcus mutans* ATCC 25175 pada objek gelas selanjutnya ditetesi dengan menggunakan preaksi H₂O₂ 3%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gas berupa gelembung-gelembung udara pada pereaksi H₂O₂.

6.4 Uji koagulase. Pengujian ini dilakukan dengan memasukkan bakteri *Streptococcus mutans* dalam plasma sitrat, selanjutnya diamati ada tidaknya gumpalan yang terbentuk. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gumpalan.

7. Pengujian aktivitas antibakteri

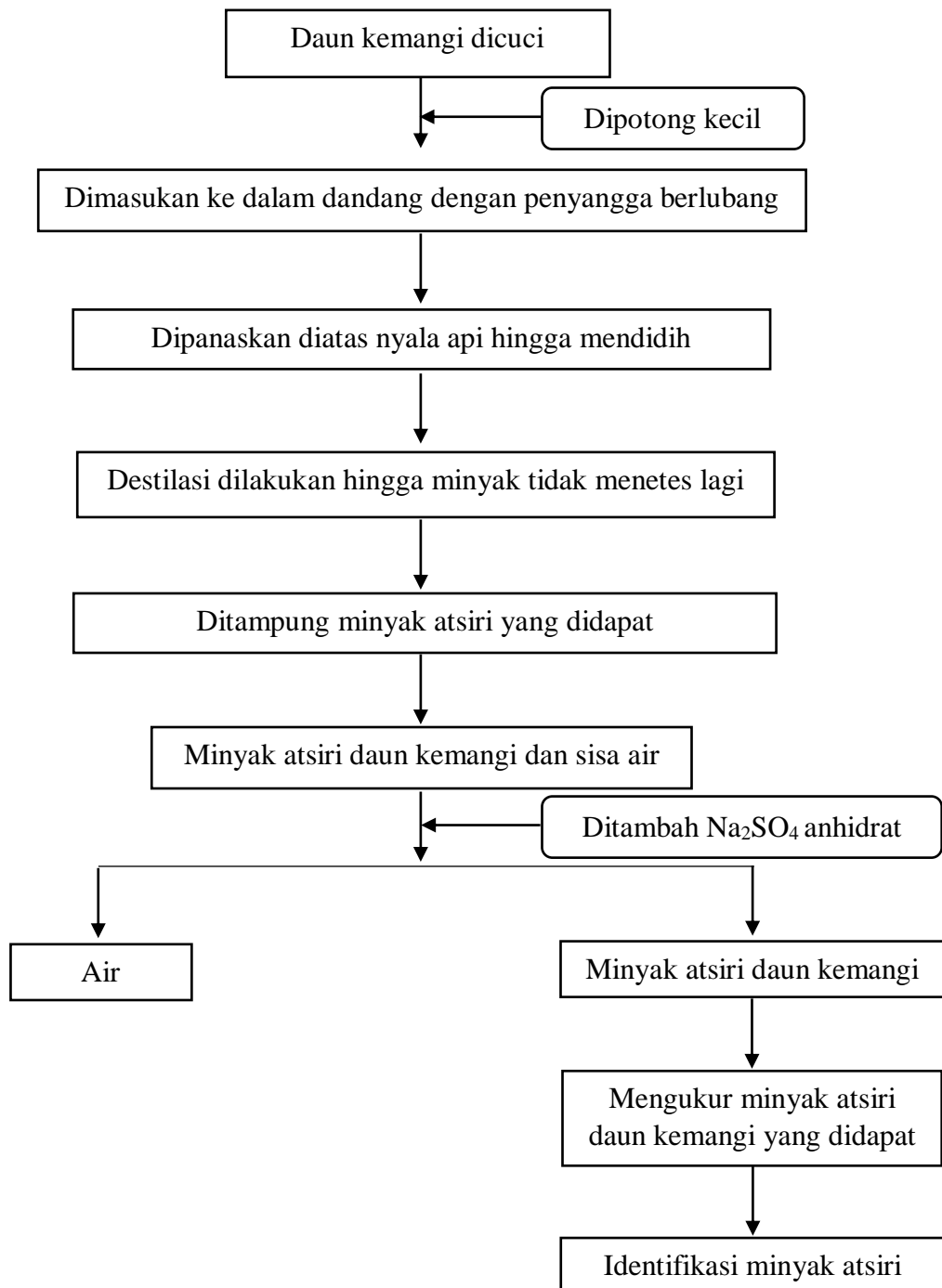
Pengujian antibakteri secara difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Pengujian dilakukan dengan mengambil bakteri dari media BHI dengan menggunakan kapas lidi steril sebanyak satu kali kemudian dioleskan pada cawan petri yang berisi MHA 50 ml dan tunggu hingga bakteri berdifusi ke dalam media. Suspensi bakteri diulas pada cawan petri menggunakan kapas lidi steril, lakukan secara aseptis.

Cakram berukuran 6 mm yang diisi kombinasi minyak atsiri (1:1), (1:2), (2:1), (1:3), (3:1) yang telah diberi tween 80 1% sebagai emulgator. Cakram disk yang direndam selama 5 menit. Kontrol positif (+) cakram eritromisin 5 µg dan kontrol negatif berupa kertas cakram yang direndam dalam aquadest steril. Setelah itu cakram diletakkan pada media MHA dengan menggunakan pinset, cawan diletakkan pada suhu kamar sebelum inkubasi. Cawan petri di inkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. 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 yang diperoleh dijumlah dan dibagi dengan banyaknya pengukuran untuk mendapatkan besarnya zona hambat yang terbentuk. Konsentrasi hambat minimum (KHM) ditentukan secara visual, karena konsentrasi senyawa uji terendah yang dapat menyebabkan zona hambat pertumbuhan dapat dikenali (Choma 2010). Skema pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada gambar 7.

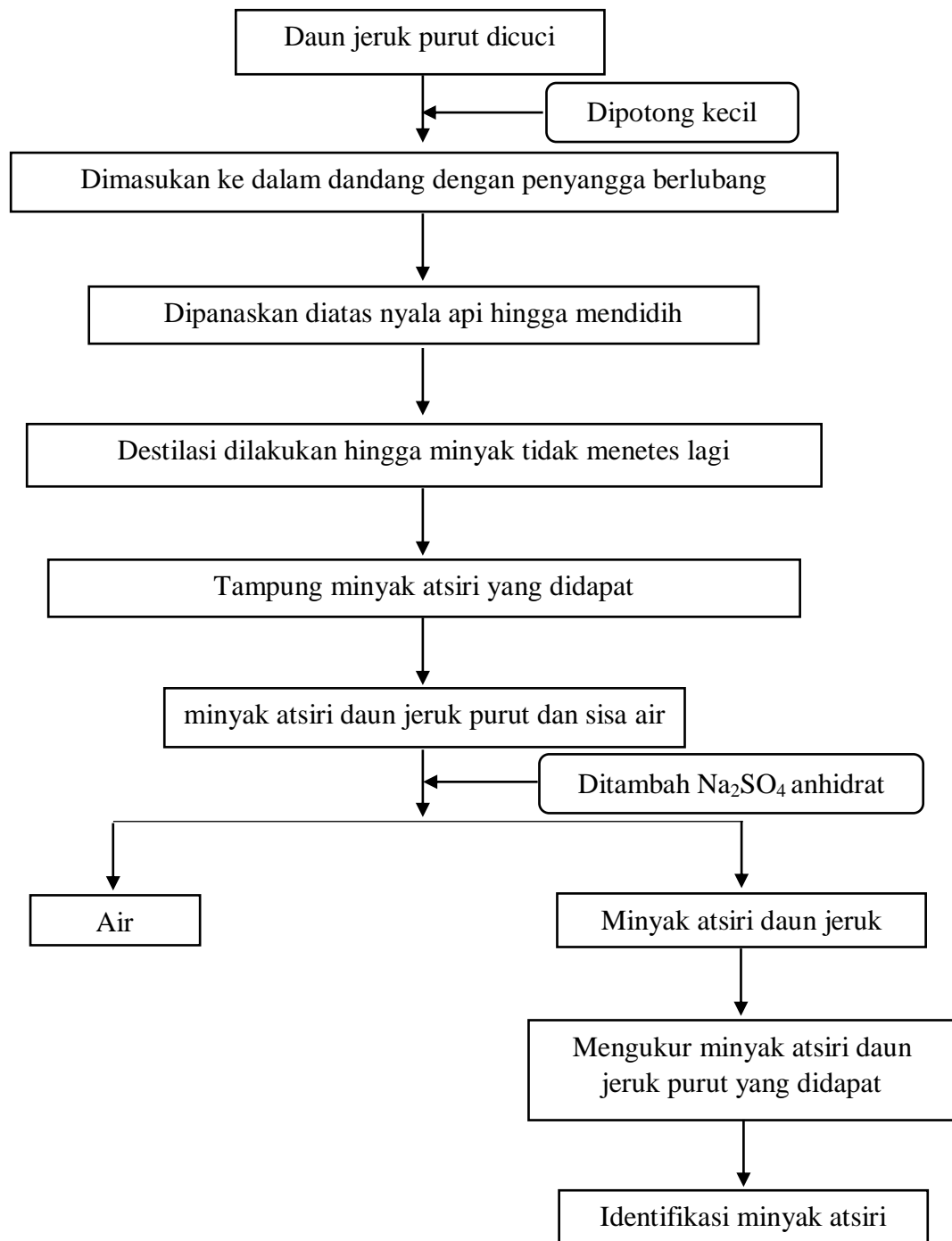
E. Analisis Hasil

Data hasil penelitian dari uji aktivitas antibakteri kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk purut 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

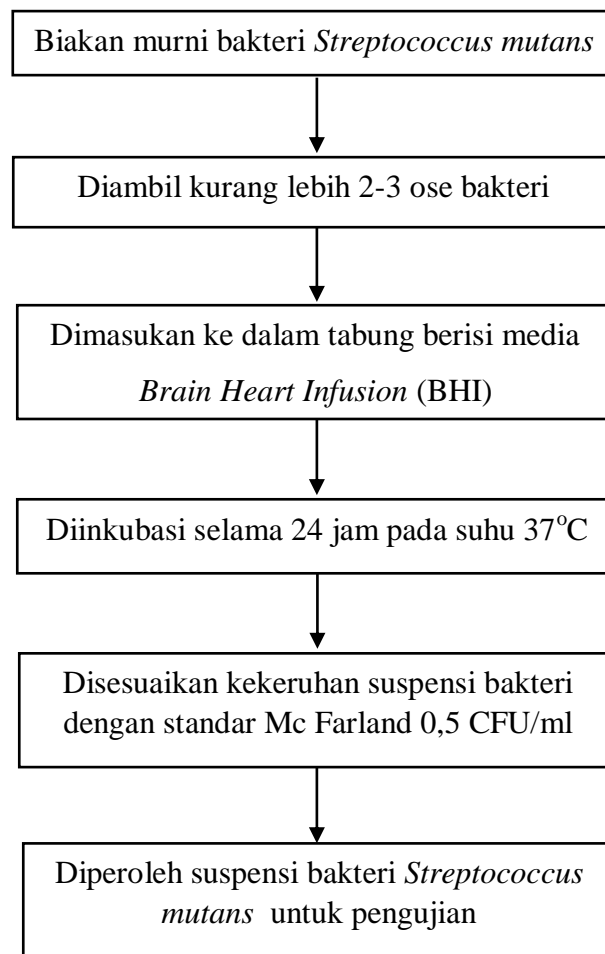
data yang diperoleh dianalisis menggunakan *Kolmogorof-Smirnov*, jika terdistribusi secara normal dan homogen dilanjutkan dengan *Analysis Of Varian* (ANOVA) dua jalur.



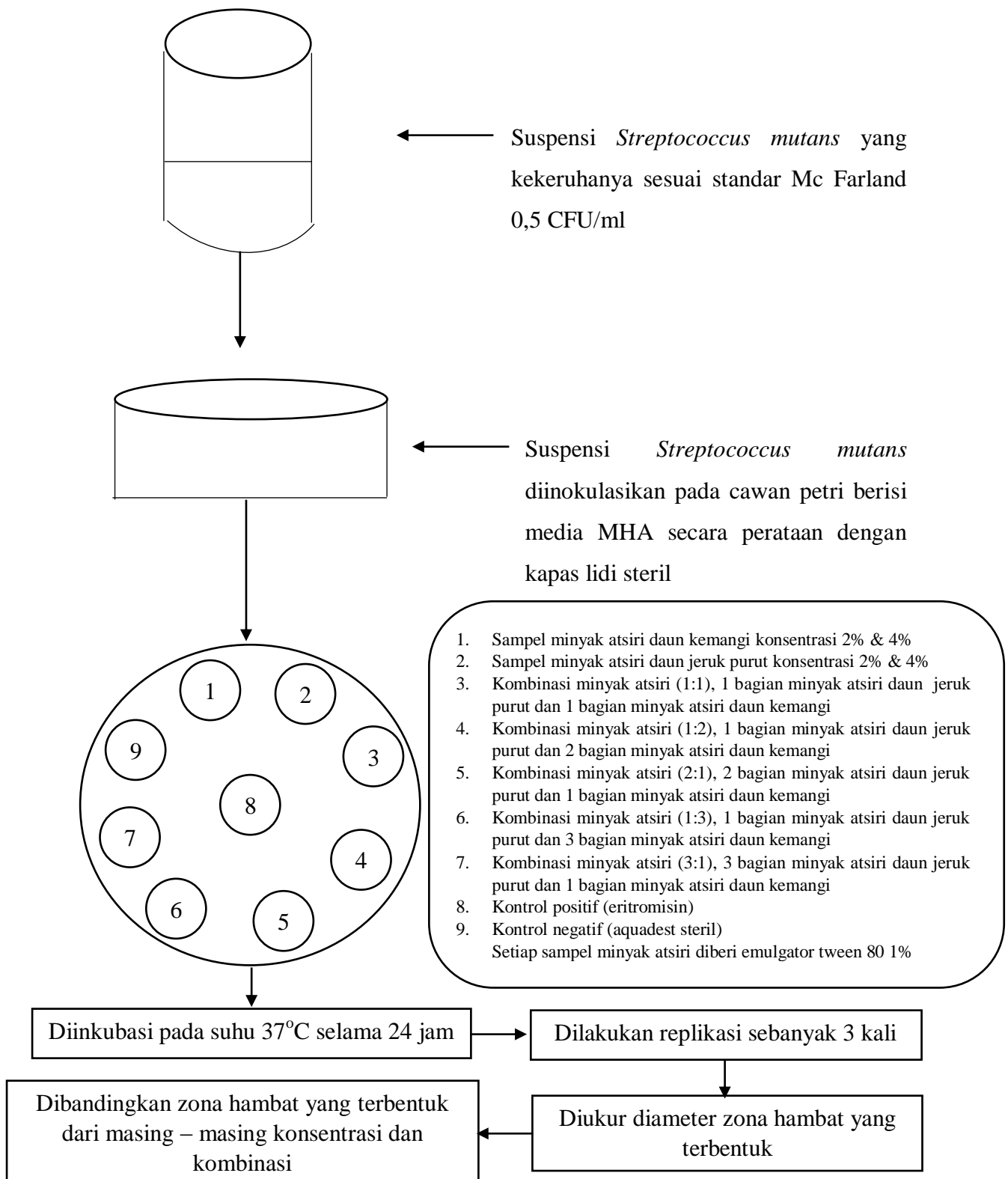
Gambar 4. Skema isolasi minyak atsiri daun kemagi



Gambar 5. Skema isolasi minyak atsiri daun jeruk purut



Gambar 6. Skema pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*



Gambar 7. Skema pengujian aktivitas antibakteri secara difusi