

BAB III
METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum*) dan Kulit Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia swingle*) sebagai bahan baku antiseptic. Penelitian yang dilakukan menggunakan rancangan acak lengkapfaktorial yang merupakan eksperimen menggunakan dari satu perlakuan atau lebih dari satu variabel bebas, rancangan lengkap faktorial digunakan apabila terdiri atas dua faktor atau lebih dengan menggunakan kombinasi antar level (Herdianto, 2013), blok sampel yang digunakan randomized sampling yang terdiri dari 4 level konsentrasi dan 2 bahan yang digunakan, sehingga jumlah variasi yang didapatkan yaitu 16 kombinasi, secara lengkap variasi perlakuan adalah sebagai berikut :

Tabel 3.1
Konsentrasi Dan Bahan Yang Digunakan Dari Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum basilicum*) Dan Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia swingle*) Sebagai Bahan Baku Antiseptic

Konsentrasi kulit jeruk nipis (<i>Citrus aurantifolia swingle</i>)	Konsentrasi ekstrak daun kemangi (<i>Ocimum Basilicum</i>)			
	K0	K1.0,25%	K2.0,5%	K3.1%
J0	0%.0%	0,25%.0%	0,5%.0%	1%.0%
J10.25%%	0%.0,25%	0,25%.0,25%	0,5%.0,25%	1%.0,25%
J2.0,5%	0%.0,5%	0,25%.0,5%	0,5%.0,5%	1%.0,5%
J3.1%	0%.1%	0,25%.1%	0,5%.1%	1%.1%

Sumber : Data penelitian, 2021

K0/J0 : Kontrol

B. Lokasi Dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian akan dilaksanakan di dua tempat yaitu Laboratorium Pengujian Mutu Hasil Pertanian Universitas Lampung dan Laboratorium Politeknik Kesehatan Tanjungkarang jurusan Kesehatan Lingkungan Program Studi Diploma tiga Sanitasi Lingkungan dan dilaksanakan penelitian ini pada bulan Februari sampai bulan Mei 2021.

C. Subjek Penelitian Bahan Uji

Besar sampel untuk 2 kali penelitian sebanyak 16 sampel yang akan di uji cobakan di Laboratorium Politeknik Kesehatan Tanjungkarang jurusan Kesehatan Lingkungan Program Studi Diploma tiga Sanitasi Lingkungan. Banyaknya replikasi/perlakuan setiap perlakuan dicari menggunakan rumus Federer (1977) sebagai berikut :

$$T (r - 1) \geq 15$$

$$16 (r - 1) \geq 15$$

$$16 (r - 1) \geq 15$$

$$16 (r - 15) \geq 15$$

$$15 r \geq 15 + 15$$

$$15 r \geq 30$$

$$r \geq \frac{30}{15} = 2$$

t = pengulangan

r = replikasi

Berdasarkan perhitungan diatas maka replikasi penelitian diperlukan sebanyak 2 kali pengulangan sebanyak 32 sampel .

Penelitian ini menggunakan hasil dari tabel random number yang akan

menentukan jumlah angka populasi sampel yang diujikan,dengan hasil sebagai berikut :

Tabel 3.2
Tabel randomisasi

A1 B1	A2 B4	A3 B0	A2 B2	A2 B1	A2 B0	A1 B0	A0 B3	A1 B3	A2 B4	A2 B3	A0 B2	A0 B1	A0 B0	A0 B4
0,25 %*0 ,25 %	0,25 %*0 ,5%	0,25 %*1 %	0,5 %*0 ,25 %	0,5 %* 0,5 %	0,5 %* 1%	1%* 0,25 %	1%* 0,5 %	1%* 1%	0,25 %	0,5 %	1%	0,25 %	0,5 %	1%
000	118	184	187	21 3	268	328	617	679	747	775	813	843	863	951

Sumber : Data penelitian,2021

D. Variabel Penelitian

Variabel bebas/input (*independent*) dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kemangi dan kulit jeruk nipis , proses pembuatan menggunakan inokulasi atau penanaman bakteri pada media EMB dan variabel terkendali/output (*dependen*) dalam penelitian ini adalah jumlah koloni yang dihasilkan .

E. Definisi Oprasional

Tabel 3.4
Definisi Oprasional

No	Variabel Penelitian	Definisi Oprasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Kemampuan ekstrakdaun kemangi (<i>Ocimum Basilicum</i>) setelah digores bakteri <i>E.coli</i>	Banyaknya koloni yang terdapat pada cawan petri setelah diberi konsentrasi 0%, 0,25%, 0,5%, 1%	Colony counter	Observasi pengamatan	Koloni	Interval
2	Kemampuan ekstrak Kulit jeruk nipis (<i>Citrus aurantifolia swingle</i>) setelah digores bakteri <i>E.coli</i>	Banyaknya koloni yang terdapat pada cawan petri setelah diberi konsentrasi 0%, 0,25%, 0,5%, 1%	Colony counter	Observasi pengamatan	Koloni	Interval

3	Kemampuan ekstrak daun kemangi (<i>Ocimum Basilicum</i>) dan kulit jeruk nipis (<i>Citrus aurantifolia swingle</i>) setelah digores bakteri <i>E.coli</i>	Banyaknya koloni yang terdapat pada cawan petri setelah diberi konsentrasi pada : a. Daun kemangi : 0%,0,25%,0,5%,1% b. Kulit jeruk nipis : 0%,0,25%,0,5%,1%	Colony counter	Observasi Pengamatan	Koloni	Interval
---	---	--	----------------	----------------------	--------	----------

F. Teknik Pengumpulan Data

Tabel 3.5
Teknik Pengumpulan Data

No	Variabel	Teknik Pengumpulan Data
1	kemampuan ekstrak daun kemangi (<i>Ocimum basilicum</i>) setelah digores bakteri <i>E.coli</i>	Observasi pengamatan Alat ukur Colony Counter Setiap terdapat koloni di cawan petri, maka ditandai Diamati di setiap koloni yang ada di cawan petri
2	Kemampuan ekstrak Kulit Jeruk nipis (<i>Citrus aurantifolia swingle</i>) setelah digores bakteri <i>E.coli</i>	Observasi pengamatan Alat ukur Colony Counter Setiap terdapat koloni di cawan petri, maka ditandai Diamati di setiap koloni yang ada di cawan petri
3	Kemampuan ekstrak daun kemangi (<i>Ocimum basilicum</i>) dan kulit jeruk nipis (<i>Citrus aurantifolia swingle</i>) setelah digores bakteri <i>E.coli</i>	Observasi pengamatan Alat ukur Colony Counter Setiap terdapat koloni di cawan petri, maka ditandai Diamati di setiap koloni yang ada di cawan petri

G. Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

a. Coding

Coding adalah mengubah data berbentuk kalimat/huruf menjadi suatu data angka atau bilangan.

b. Editing

Sebelum data diolah, data perlu diedit terlebih dahulu. Data atau keterangan yang telah dikumpulkan dalam *record book* perlu dibaca

sekali lagi apabila masih terdapat hal-hal yang salah atau meragukan maka perlu diperbaiki.

c. *Cleaning*

Semua data dari setiap sumber data selesai dimasukkan, perlu dicek kembali untuk melihat kemungkinan adanya kesalahan kode, tidak lengkapnya data dan sebagainya, kemudian dilakukan pembetulan atau koreksi.

d. *Tabulating*

Memasukkan data ke dalam tabel-tabel, dan mengatur angka-angka sehingga dapat dihitung jumlah kasus dalam berbagai kategori.

2. Analisis Data

Analisis Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis bivariat karena penelitian ini dilakukan terhadap dua variabel yang diduga berhubungan atau berkorelasi (Notoadmodjo, 2014). Analisis yang digunakan untuk mengetahui perbedaan hubungan masing-masing variabel bebas (*independen*) terhadap variabel terikat (*dependen*) dan teknik analisis data menggunakan *Two way anova*.

H. Tahapan Penelitian

1. Pengumpulan alat dan bahan yang akan diujikan saat penelitian
2. Melakukan penyulingan ekstrak daun kemangi dan kulit jeruk nipis metode distilasi uap di Laboratorium Pengujian Mutu Hasil Pertanian Universitas Lampung.

3. Bakteri *E.coli* yang sudah di strain ulang dalam bentuk padat didapatkan di jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang yang sebelumnya dibuat biakan awal dari Laboratorium Universitas Indonesia.



Gambar 3.1
Bakteri *E.coli* yang sudah dibiakan dalam bentuk padat

4. Media EMB yang didapatkan dari Jurusan Kesehatan Lingkungan Poltekkes Tanjungkarang.
5. Melakukan pengenceran ekstrak setiap konsentrasi yang dipakai untuk penelitian yang akan diujikan .
6. Sampel yang diujikan sebanyak 16 sampel dan dilakukan replikasi sebanyak 2x
7. Melakukan penanaman media dengan menggunakan metode EMB agar yang akan di inkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37⁰c
8. Setelah di inkubasi melakukan pengamatan dan perhitungan terhadap koloni yang ada pada cawan petri menggunakan metode *colony counter*.

I. Prosedur kerja

1. Siapkan alat dan bahan yang akan dipakai, seperti :
 - a. Alat
 - 1) Gelas ukur
 - 2) Pipet tetes

- 3) Pipet ukur
- 4) Neraca analitik
- 5) 30 cawan petri
- 6) 16 botol spray
- 7) Erlenmeyer
- 8) Jarum ose
- 9) Kapas dan aluminium foil
- 10) Inkubator
- 11) Beaker glass
- 12) Distilasi uap dan air

b. Bahan

- 1) Daun kemangi
- 2) Kulit jeruk nipis
- 3) Media EMB agar
- 4) Bakteri *E.coli* padat
- 5) Aquadest
- 6) Alkohol 96%
- 7) N-Heksana

2. Langkah kerja

a. Pembuatan ekstrak daun kemangi dan penyulingan :

- 1) Siapkan alat dan bahan
- 2) 2 kg Tanaman kemangi dicuci terlebih dahulu,
- 3) lalu siapkan wadah untuk merendam kemangi

- 4) Tanama kemangi di maserasi dengan alcohol 96% sebanyak 2 Liter selama 16 jam dan ditutup dengan plastic perekat
 - 5) Kemudian setelah 16 jam di maserasi, wadah larutan kemangi dibuka plastic perekatnya dan dilakukan pemindahan larutan dari wadah ke botol kosong ukuran 2 Liter
 - 6) Setelah dilakukan pemindahan kedalam botol ukuran 2 Liter, larutan kemangi disuling menggunakan alat evaporator (pemisah larutan dengan alcohol)
 - 7) Alat pemanas dihidupkan dan uap panas ditahan hingga air mendidih.
 - 8) Setelah itu, Uap dialirkan ketempat sampel dengan aliran konstanlalu
 - 9) alkoholyang terpisah dari larutan dilewatkan ke pendingin air
 - 10) kemudian ditampung dengan labu ukur.
 - 11) Penyulingan dilakukan selama ± 3 jam.
 - 12) Hasil ekstrak kemangi setelah di distilasi mendapatkan 10ml ekstrak.
- b. Pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis dan penyulingan ;
- 1) Siapkan alat dan bahan
 - 2) 5 kg jeruk nipis dicuci terlebih dahulu ,
 - 3) Setelah dicuci lakukan pemerasan pada jeruk nipis
 - 4) Lalu pisahkan air perasan dengan cangkang jeruk nipis yang akan diambil kulitnya

- 5) Setelah dipisahkan kulit jeruk nipis digabung menjadi satu lalu ditimbang dan menghasilkan 2kg kulit jeruk nipis
- 6) Lalu setelah ditimbang siapkan wadah untuk merendam kulit jeruk nipis
- 7) Kulit jeruk nipis di maserasi dengan alcohol 96% sebanyak 2 Liter selama 16 jam dan ditutup dengan plastic perekat
- 8) Kemudian setelah 16 jam di maserasi, wadah larutan kulit jeruk nipis dibuka plastic perekatnya dan dilakukan pemindahan larutan dari wadah ke botol kosong ukuran 2 Liter
- 9) Setelah dilakukan pemindahan kedalam botol ukuran 2 Liter, larutan kulit jeruk nipis disuling menggunakan alat evaporator (pemisah larutan dengan alcohol)
- 10) Alat pemanas dihidupkan dan uap panas ditahan hingga air mendidih.
- 11) Setelah itu, Uap dialirkan ketempat sampel dengan aliran konstan lalu
- 12) alkohol yang terpisah dari larutan dilewatkan ke pendingin air
- 13) kemudian ditampung dengan labu ukur.
- 14) Penyulingan dilakukan selama \pm 3 jam.
- 15) Hasil ekstrak kulit jeruk nipis setelah di distilasi mendapatkan 10ml ekstrak.



Gambar 3.2

Alat penyulingan uap-air

- c. Ekstrak daun kemangi dan kulit jeruk nipis dilakukan uji coba sampai 3 tahap konsentrasi, yaitu :

$$\text{Rumus : } V1 \times N1 = V2 \times N2$$

Ket

V1 = Volume larutan sebelum diencerkan (ml)

N1 = Konsentra larutan sebelum diencerkan (%)

V2 = Volume larutan sesudah diencerkan (ml)

N2 = Konsentra larutan sesudah diencerkan (%)

10% = Konsentrasi Ekstrak total

10ml = Volume Estrak total

1. Tahap 1 : ekstrak daun kemangi dilakukan pengenceran dengan konsentrasi ;

a) 0,25%

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 10\% = 10\text{ml} \times 0,25\%$$

$$10\% = 10\text{ml} \times 0,25\%$$

$$V1 = \frac{2,5}{100}$$

$V1 = 0,025 \text{ ml} + 10 \text{ ml n-Heksana}$ sebagai bahan pelarut ekstrak

b) 0,5 %

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 10\% = 10 \text{ ml} \times 0,5\%$$

$$10\% = 10 \text{ ml} \times 0,5\%$$

$$V1 = \frac{5}{100}$$

$V1 = 0,05 \text{ ml} + 9 \text{ ml n-Heksana}$ sebagai bahan pelarut ekstrak

c) 1 %

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 10\% = 10 \text{ ml} \times 1\%$$

$$10\% = 10 \text{ ml} \times 1\%$$

$$V1 = \frac{10}{100}$$

$V1 = 0,1 \text{ ml} + 8 \text{ ml n-Heksana}$ sebagai bahan pelarut ekstrak

2. Tahap 2 : ekstrak kulit jeruk nipis dilakukan pengenceran dengan konsentrasi ;

a). 0,25%

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 10\% = 10 \text{ ml} \times 0,25\%$$

$$10\% = 10 \text{ ml} \times 0,25\%$$

$$V1 = \frac{2,5}{100}$$

$V1 = 0,025 \text{ ml} + 10 \text{ ml n-Heksana}$ sebagai bahan pelarut ekstrak

b). 0,5 %

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 10\% = 10\text{ml} \times 0,5\%$$

$$10\% = 10\text{ml} \times 0,5\%$$

$$V1 = \frac{5}{100}$$

V1 = 0,05 ml + 9 ml n-Heksana sebagai bahan pelarut ekstrak

c). 1 %

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 10\% = 10\text{ml} \times 1\%$$

$$10\% = 10\text{ml} \times 1\%$$

$$V1 = \frac{10}{100}$$

V1 = 0,1 ml + 8 ml n-Heksana sebagai bahan pelarut ekstrak

3. Tahap 3 : campuran ekstrak daun kemangi dan kulit jeruk nipis yang sudah dilakukan pengenceran dengan konsentrasi, sbb :

a) Daun kemangi

- 0,25% = 0,025 ml + 10 ml n-Heksana sebagai bahan pelarut ekstrak

- 0,5 % = 0.05 ml+ 9 ml n-Heksana sebagai bahan pelarut ekstrak

- 1% =0,1 ml+ 8 ml n-Heksana sebagai bahan pelarut ekstrak

b) Kulit jeruk nipis

- 0,25% = 0,025 ml + 10 ml n-Heksana sebagai bahan pelarut ekstrak

- 0,5 % = 0.05 ml+ 9 ml n-Heksana sebagai bahan pelarut ekstrak

- 1% =0,1 ml+ 8 ml n-Heksana sebagai bahan pelarut ekstrak

d. Strain bakteri *E.coli*

- 1) Strain bakteri yang akan ditanam ke media NB
- 2) Diinkubasi selama 4 jam
- 3) Siapkan NaCl sebanyak 0,85%
- 4) Lalu, siapkan suspensi NaCl dan media NB yang sudah ditanam bakteri dalam tabung reaksi
- 5) Hasil koloni dari strain bakteri memiliki koloni yang tak terhingga atau >1.000/CFU/tabung reaksi.(McFarland; Anonim, 2014).

e. Pembuatan media EMB agar

- 1) Timbang 12gr bubuk media EMB, larutkan dengan aquadest sebanyak 320 ml.
- 2) Hidupkan kompor lalu panaskan sampai mendidih untuk melarutkan media.
- 3) Lalu sterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- 4) Tunggu suhu sampai hangat-hangat kuku (45°C-50°C), homogenkan Tuang ke dalam cawan petri sebanyak 10 ml ke cawan petri sebanyak 30 cawan petri yang sudah disterilkan sebelumnya.
- 5) Setelah selesai sampai 30 cawan petri setelah itu cawan petri yang berisi media EMB agar di inkubasi selama 24 jam
- 6) Hitungan pembuatan media EMB agar

$$1 \text{ petridis} = 10 \text{ ml}$$

$$1 \text{ sampel} = 32 \text{ petridis} \times 10 \text{ ml}$$

$$= 320 \text{ ml}$$

$$\text{Media EMB} = \frac{36}{1000} \times 320 \text{ ml}$$

$$= 11,52 \text{ gr} / 12 \text{ gram}$$

f. Penyemprotan ekstrak daun kemangi dan kulit jeruk nipis

Penyemprotan ekstrak dilakukan dengan 3 perlakuan, sbb :

a. perlakuan 1 :

- 1) Siapkan alat dan bahan

- 2) Ekstrak daun kemangi yang sudah dihitung konsentrasinya dilarutkan dengan N-Heksana
- 3) Setelah dilarutkan ekstrak daun kemangi dituangkan pada botol spray 30 ml
- 4) Lalu, ekstrak daun kemangi disemprotkan pada cawan petri yang belum digores bakteri *E.coli*.
- 5) Dan penyemprotan dilakukan sebanyak 2-5 kali penyemprotan
- 6) Setelah dilakukan penyemprotan ekstrak melakukan penanaman bakteri setelah itu cawan petri ditutup
- 7) kembali dan diberi label .

b. perlakuan 2 :

- 1) Siapkan alat dan bahan
- 2) Ekstrak kulit jeruk nipis yang sudah dihitung konsentrasinya dilarutkan dengan N-Heksana
- 3) Setelah dilarutkan ekstrak kulit jeruk nipis dituangkan pada botol spray 30 ml
- 4) Lalu, ekstrak kulit jeruk nipis disemprotkan pada cawan petri yang belum digores bakteri *E.coli*.
- 5) Dan penyemprotan dilakukan sebanyak 2-5 kali penyemprotan
- 6) Setelah dilakukan penyemprotan ekstrak melakukan penanaman bakteri setelah itu cawan petri ditutup dan diberi label.

c. perlakuan 3 :

- 1) Siapkan alat dan bahan
- 2) Pisahkan ekstrakdaun kemangi dan kulit jeruk nipis yang sudah diberi konsentrasi dan dilakukan pengenceran
- 3) Lalu, ekstrakdaun kemangi dan kulit jeruk nipis dilarutkan dengan N-Heksana
- 4) Setelah dilarutkan ekstrakdaun kemangi dan kulit jeruk nipis dituangkan pada botol spray 30 ml dan diberi label konsentrasi
- 5) Lalu, ekstrak daun kemangi dan kulit jeruk nipis yang sudah diberi label disemprotkan pada cawan petri yang belum ditanamkan digores bakteri *E.coli*.

- g. Penanaman bakteri dengan teknik gores
- 1) Menyiapkan 30 cawan petri (2x perlakuan) yang berisi media EMB Agar yang sudah didiamkan selama ± 15 menit dan digores bakteri *E.coli* .
 - 2) Siapkan biakan bakteri *E.coli* padat yang akan ditanam kembali.
 - 3) Bakar kawat ose, biarkan dingin.
 - 4) Sentuhkan ujung kawat ose pada bakteri.
 - 5) Goreskan kawat ose pada permukaan agar miring secara zigzag.
 - 6) Bakar kembali kawat ose dan lakukan perlakuan sampai 30 cawan petri yang akan digoreskan secara zigzag
 - 6 cawan petri untuk blanko
 - 9 cawan petri untuk perlakuan
 - 7) Lalu lakukan penyemprotan ekstrak daun kemangi dan kulit jeruk nipis pada masing-masing cawan petri.
 - 8) Dan penyemprotan dilakukan sebanyak 2-5 kali penyemprotan
 - 9) Setelah selesai diberi label 30 cawan petri di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
- h. Pengamatan dengan metode *colony counter*
- 1) Hubungkan stop kontak dengan sumber tenaga.
 - 2) Nyalakan alat dengan menekan tombol 'ON'.
 - 3) Reset jumlah perhitungan hingga menunjuk angka '0'.
 - 4) Letakkan cawan petri yang berisi koloni bakteri yang akan dihitung di atas meja yang dilengkapi dengan skala.
 - 5) Tandai koloni dengan mengarahkan pulpen ke meja skala.
 - 6) Hitung koloni bakteri yang terpisah.
 - 7) Lihat koloni dengan bantuan kaca pembesar.
 - 8) Matikan alat dengan menekan tombol 'OFF'.