



**AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI BATANG
SEREH (*Cymbopogon citratus*) TERHADAP
Propionibacterium acnes SECARA
*IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh

**Diastri Nur Suprobo Dewi
NIM 122010101088**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI BATANG
SERAH (*Cymbopogon citratus*) TERHADAP
Propionibacterium acnes SECARA
*IN VITRO***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Diastri Nur Suprobo Dewi
NIM 122010101088**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dengan seluruh rahmat, hidayah, serta kasih sayang-Nya yang membuat saya selalu bersyukur atas ridho dan amanah-Nya sehingga saya bisa berkesempatan untuk belajar ilmu yang luar biasa ini;
2. Ayahanda Sunarto, S.Pd dan Ibunda dra. Liliék Sumarni tercinta, serta kedua kakakku tersayang yang senantiasa memberikan doa, dukungan, kasih sayang tiada henti, serta pengorbanan yang dilakukan untuk saya setiap waktu;
3. Para pahlawan tanpa tanda jasa, yang telah memberi ilmu dan mendidik saya dengan susah payah dan penuh kesabaran dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi untuk menjadikanku manusia yang berilmu, bertakwa, dan bermanfaat;
4. Almamaterku tercinta Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas seluruh kesempatannya untuk menimba ilmu yang berharga ini.

MOTO

Istafti qalbak, mintalah fatwa pada hatimu. *)

*) Muhammad SAW

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Diastri Nur Suprobo Dewi

NIM : 122010101088

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Batang Sereh (*Cymbopogon citratus*) terhadap *Propionibacterium acnes* secara *In Vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 Desember 2015

Yang menyatakan,

Diastri Nur Suprobo Dewi

NIM 122010101088

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI BATANG
SERAH (*Cymbopogon citratus*) TERHADAP
Propionibacterium acnes SECARA
*IN VITRO***

Oleh

Diastri Nur Suprobo Dewi
NIM 122010101088

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : dr. Dini Agustina, M.Biomed

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Yudha Nurdian, M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Batang Sereh (*Cymbopogon citratus*) terhadap *Propionibacterium acnes* secara *In Vitro*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 30 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Penguji I,

Penguji II,

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP 19700214 199903 2 001

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si
NIP 19840916 200801 2 003

Penguji III

Penguji IV

dr. Dini Agustina, M.Biomed
NIP 19830801 200812 2 003

dr. Yudha Nurdian, M.Kes
NIP 19711019 199903 1 001

Mengesahkan
Dekan,

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Batang Sereh (*Cymbopogon citratus*) terhadap *Propionibacterium acnes* secara *In Vitro*; Diastri Nur Suprobo Dewi; 122010101088; 2015; 54 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Akne vulgaris/jerawat adalah penyakit peradangan kelenjar sebacea yang sering dijumpai dan sering disebabkan oleh *Propionibacterium acnes*. Bakteri ini merupakan flora normal gram positif, patogen fakultatif, bentuk batang tidak teratur, dan tumbuh anaerob. Akne paling banyak terjadi di wajah, punggung dan badan. Penyakit ini ditandai oleh lesi non-inflamasi seperti komedo dan lesi inflamasi berupa papul, pustul, hingga nodul dan kista. Antibiotik sudah secara luas digunakan sebagai salah satu pengobatan efektif. Klindamisin adalah salah satu antibiotik yang paling sering digunakan. Terapi ini tidak hanya menurunkan jumlah *P. acnes* pada kulit, tetapi juga bekerja menurunkan jumlah mediator inflamasi, meskipun obat ini tidak mengurangi produksi sebum. Banyaknya resistensi membuat peneliti tertarik untuk meneliti bahan alami, salah satunya adalah sereh (*C. citratus*). Secara umum minyak atsiri batang sereh mengandung terpenoid dan fenil propana yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui aktivitas minyak atsiri batang sereh dalam menghambat pertumbuhan *P. acnes* secara *in vitro*. Hasil penelitian diharapkan dapat bermanfaat untuk pengembangan obat akne dan dapat dijadikan sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya.

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental semu (*Quasi Experimental Design*). Tidak ada randomisasi yang ketat pada pengelompokan kelompok eksperimen dan kelompok kontrol karena semua sampel telah homogen. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan postes dengan kelompok kontrol (*Post Test Only Control Group Design*).

Penelitian ini menggunakan sampel bakteri *P. acnes* yang diperoleh dari Lab. Mikrobiologi FK UNEJ yang disesuaikan dengan standar 0,5 Mc Farland. Sereh pada penelitian ini diperoleh dari LIPI Purwodadi Jawa Timur. Pembuatan minyak atsiri batang sereh dilakukan di Lab. RPHP FTP UNEJ. Tempat uji aktivitas antibakteri minyak atsiri batang sereh dilakukan di Lab. Mikrobiologi FK UNEJ.

Minyak atsiri batang sereh diencerkan sehingga didapatkan konsentrasi 10 µl/ml, 30 µl/ml, 50 µl/ml, 60 µl/ml, 70 µl/ml, 85 µl/ml, 100 µl/ml, 150 µl/ml, dan 175 µl/ml *tween-80*. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran. Sumuran dicetak pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah diolesi bakteri, kemudian ditetesi dengan konsentrasi minyak atsiri masing-masing sebanyak 100 µl. Kontrol positif menggunakan klindamisin dengan konsentrasi 20 µg/ml dan kontrol negatif menggunakan *tween-80*. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37° C. Setelah 18–24 jam, diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dan ditentukan (KHM) Konsentrasi Hambat Minimum secara kualitatif.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa minyak atsiri batang sereh memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *P. acnes* secara *in vitro*. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar sumuran yang diberi konsentrasi minyak atsiri batang sereh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa KHM kualitatif adalah 30 µl/ml. Setelah diuji menggunakan *Kruskal Wallis*, didapatkan nilai $p = 0,00$ yang berarti terdapat perbedaan signifikan pada minimal dua kelompok perlakuan minyak atsiri batang sereh terhadap pertumbuhan *P. acnes*. Hasil uji korelasi bivariat *Pearson* didapatkan $r = 0,866$ yang menunjukkan korelasi positif bermakna sangat kuat. Hasil uji regresi logaritmik menunjukkan terdapat pengaruh signifikan variabel bebas terhadap variabel terikat ($p = 0,00$). Dari persamaan regresi didapatkan konsentrasi hambat minimum secara kuantitatif adalah sedikit di atas 15,95 µl/ml.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas limpahan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Batang Sereh (*Cymbopogon citratus*) terhadap *Propionibacterium acnes* secara *In Vitro*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah memberikan kesempatan dan segala fasilitas selama menempuh pendidikan dokter di Universitas Jember;
2. dr. Dini Agustina, M.Biomed dan dr. Yudha Nurdian, M.Kes selaku Dosen Pembimbing yang telah membantu membimbing dan bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikirannya dalam penulisan tugas akhir ini;
3. dr. Enny Suswati, M.Kes dan dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si sebagai Dosen Penguji yang banyak memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. Ayahanda Sunarto, S.Pd dan Ibunda dra. Liliek Sumarni tercinta, yang senantiasa memberikan doa, dukungan, kasih sayang tiada henti, serta pengorbanan yang dilakukan untuk saya setiap waktu;
5. Kakak-kakak tercinta, dr. Mega Nur Purbo Sejati dan Andriyani Dwi Wardani, S.Kep, yang tidak bosan-bosannya memberikan dukungan untuk tetap semangat;
6. Kelompok skripsi saya, Ulva Septiana dan Yunita Wulansari, yang selama ini selalu memberikan doa, dukungan, dan kekuatan untuk terus maju;

7. Sahabat-sahabat saya Davina Amalia, Rinda Yanuarisa, Siti Sarah Hajar, Dina Aprilianti, dan Aulia Suri Agung, yang selama ini selalu mengisi hari-hari saya, memberikan doa, dukungan dan kekuatan untuk terus maju;
8. Saudara-saudaraku “angkatan X TBM Vertex”, yang senantiasa memberikan dukungan dan semangat untuk menghadapi rintangan;
9. Sejawatku “Panacea” Fakultas Kedokteran Universitas Jember, terimakasih atas dukungan dan semangat yang selalu diberikan kepada saya;
10. Teknisi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, terimakasih atas bantuan, kerjasama, dan masukannya selama penelitian skripsi ini; dan
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi banyak pihak.

Jember, 30 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Propionibacterium acnes</i>	5
2.1.1 Sistem Klasifikasi	5
2.1.2 Morfologi dan Identifikasi Bakteri	5
2.1.3 Patogenesis	6
2.1.4 Manifetasi Klinis.....	7
2.1.5 Pengobatan	8

2.2 Sereh (<i>Cymbopogon citratus</i>)	8
2.2.1 Sistem Klasifikasi	8
2.2.2 Deskripsi Tanaman Sereh	9
2.2.3 Penggunaan Tanaman Sereh	10
2.3 Fitokimia Minyak Atsiri Batang Sereh	11
2.4 Antibakteri	13
2.4.1 Menghambat Metabolisme Sel Bakteri.....	13
2.4.2 Menghambat Sintesis Dinding Sel Bakteri	14
2.4.3 Mengganggu Keutuhan Membran Sel Bakteri.....	14
2.4.4 Menghambat Sintesis Protein Sel Bakteri.....	14
2.4.5 Menghambat Sintesis Asam Nukleat Sel Bakteri	15
2.5 Klindamisin	15
2.6 Uji Sensitivitas Terhadap Antibiotik	16
2.6.1 Difusi.....	17
2.6.2 Dilusi.....	18
2.7 Kerangka Konsep Penelitian	19
2.8 Hipotesis	20
BAB 3. METODE PENELITIAN	21
3.1 Jenis Penelitian	21
3.2 Rancangan Penelitian	21
3.3 Metode Uji Kepekaan Bakteri	22
3.4 Sampel Penelitian	22
3.5 Tempat dan Waktu Penelitian	23
3.5.1 Tempat Penelitian	23
3.5.2 Waktu Penelitian	23
3.6 Variabel Penelitian	24
3.6.1 Variabel Bebas	24
3.6.2 Variabel Terikat	24
3.7 Definisi Operasional	24

3.7.1	Konsentrasi Minyak Atsiri.....	24
3.7.2	Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).....	25
3.7.3	Pertumbuhan bakteri <i>P. acnes</i>	25
3.7.4	Diameter Zona Hambat.....	25
3.8	Alat dan Bahan	25
3.8.1	Alat	25
3.8.2	Bahan	26
3.9	Prosedur Penelitian	26
3.9.1	Uji Identifikasi Tanaman	26
3.9.2	Persiapan Alat	26
3.9.3	Penyediaan Minyak Atsiri Batang Sereh (<i>C. citratus</i>).....	26
3.9.4	Pembuatan Media <i>Mueller Hinton</i>	27
3.9.5	Pembuatan Larutan Standar 0,5 <i>Mc Farland</i>	27
3.9.6	Pembuatan Suspensi Bakteri	28
3.9.7	Inokulasi Bakteri	28
3.9.8	Pembuatan Konsentrasi Minyak Atsiri	28
3.9.9	Pembuatan Suspensi Antibiotik	30
3.9.10	Inkubasi Bakteri	31
3.9.11	Uji Kepekaan Bakteri.....	31
3.9.12	Pengamatan	32
3.10	Analisis Data	32
3.11	Alur Penelitian	34
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1	Hasil Penelitian	35
4.2	Analisis Data	38
4.3	Pembahasan	42
BAB 5.	PENUTUP	49
5.1	Kesimpulan	49
5.2	Saran	49

DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN.....	55

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi Ilmiah <i>P. acnes</i>	5
Tabel 2.2 Klasifikasi Ilmiah Sereh (<i>C. citratus</i>)	8
Tabel 2.3 Komponen dan Persentase Minyak Atsiri.....	12
Tabel 4.1 Hasil Interpretasi Diameter Zona Hambat	36
Tabel 4.2 Interpretasi Bentuk Transformasi Data	39
Tabel 4.3 Hasil Uji <i>Post Hoc</i>	40

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman Sereh (<i>C. citratus</i>)	10
Gambar 2.2 Struktur Kimia Klindamisin	16
Gambar 2.4 Skema Kerangka Konsep Penelitian	19
Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian	22
Gambar 3.2 Skema Pengenceran Minyak Atsiri Batang Sereh (<i>C. citratus</i>).....	29
Gambar 3.3 Skema Pengenceran Antibiotik Klindamisin	30
Gambar 3.4 Penghitungan Zona Hambat	32
Gambar 3.5 Skema Alur Penelitian.....	34
Gambar 4.1 Hasil Diameter Zona Hambat.....	37
Gambar 4.2 Grafik Persamaan Regresi Logaritmik.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A Uji Normalitas	55
Lampiran B Uji Homogenitas	56
Lampiran C Uji <i>Kruskal Wallis</i>	58
Lampiran D Uji <i>Post Hoc</i>	59
Lampiran E Uji Korelasi <i>Pearson</i>	73
Lampiran F Uji Regresi Logaritmik.....	74
Lampiran G Keterangan Persetujuan Etik.....	75
Lampiran H Tanggapan Komisi Etik	76
Lampiran I Surat Keterangan Identifikasi.....	77

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Akne vulgaris atau yang dikenal dengan istilah umum jerawat adalah penyakit peradangan kelenjar sebacea yang sering dijumpai dan berkaitan dengan folikel rambut (disebut unit pilosebacea) (Miratunnisa dkk., 2015). Penyakit ini sebenarnya tidak fatal, namun cukup merisaukan karena dapat mengurangi kepercayaan diri penderitanya dan dapat meningkatkan insiden kecemasan sampai depresi. Pada umumnya akne vulgaris terdapat pada masa remaja, meskipun kadang-kadang dapat menetap sampai dekade ketiga atau bahkan pada usia yang lebih lanjut. Pada wanita, akne berkembang lebih awal daripada pria, yaitu pada saat premenarke. Lesi awal akne mungkin terlihat pada usia 8–9 tahun dan kurang lebih 50–60% terdapat pada usia remaja. Puncak insiden pada wanita dijumpai pada usia 14–17 tahun, sedangkan pada pria dijumpai antara usia 16–19 tahun. Hampir 85% anak SMA yang berusia antara 15–18 tahun, baik laki-laki maupun perempuan mempunyai berbagai derajat kelainan ini (Astuti, 2011).

Penyakit ini mempengaruhi area yang mempunyai kelenjar minyak terbesar termasuk wajah, punggung, dan badan. Umumnya dicirikan dengan pembentukan *seborrhea*, komedo, dan lesi inflamasi seperti papul, pustul, nodul dan kista (McKoy, 2015). Bakteri penyebab akne antara lain *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*. *P. acnes* yang masuk dalam penelitian ini merupakan flora normal dari kelenjar pilosebacea kulit manusia. Bakteri ini menyebabkan jerawat dengan menghasilkan lipase yang memecah asam lemak bebas dari lipid kulit. Asam lemak ini dapat mengakibatkan inflamasi jaringan ketika berhubungan dengan sistem imun dan mendukung terjadinya akne. Bakteri ini termasuk tipe bakteri anaerob gram positif yang toleran terhadap udara (Miratunnisa dkk., 2015).

Akne dapat diterapi dengan menggunakan antibiotik, asam azelat dan retinoid, namun obat-obat ini memiliki efek samping dalam penggunaannya sebagai antiakne antara lain resistensi antibiotik, iritasi, kerusakan organ dan terjadinya imunohipersensitivitas (Elvina, 2014). Antibiotik sebagai solusi untuk pengobatan akne pada beberapa dekade ini masih banyak diresepkan sebagai antibiotik pilihan. Hal ini harus ditinjau kembali untuk membatasi perkembangan resistensi antibiotik (Azrifitria dkk., 2010).

Peluang pengembangan budidaya tanaman obat-obatan di Indonesia masih sangat terbuka luas, sejalan dengan semakin berkembangnya industri jamu, obat herbal, fitofarmaka, dan kosmetika tradisional (Prasetyono, 2012). Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai alternatif obat-obatan adalah sereh (*Cymbopogon citratus*) yang biasanya digunakan sebagai bumbu dapur.

Cymbopogon citratus (DC) stapf. telah dibudidayakan selama bertahun-tahun untuk tujuan pengobatan di berbagai negara di seluruh dunia. Sereh digunakan sebagai obat tradisional untuk batuk, *elephantiasis*, malaria, *ophtalmia*, pneumonia dan gangguan vaskuler. Peneliti menemukan bahwa sereh mempunyai sifat antidepresan, antioksidan, antiseptik, *astringent*, bakterisidal, fungisidal, penenang, dan sedatif. Onawunmi dkk. mengamati bahwa organisme gram positif lebih sensitif terhadap minyak sereh daripada gram negatif. Minyak sereh ditemukan efektif melawan *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella enterica* serotipe *typhimurium*, *Serratia marcesens*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Corynebacterium equii* dan *Staphylococcus aureus* (Naik *et al.*, 2010).

Minyak atsiri dari *C. citratus* mengandung hidrokarbon monoterpena, yang terhitung sampai 94,25% dari minyak atsiri (Adesegun *et al.*, 2013). Fraksi monoterpena dikarakterisasikan dengan konten persentasi yang tinggi dari geranial (48,1%), neral (34,6%), *myrecene* (11,0%), dan seskuioterpena lainnya (6,3%) (Bassolé *et al.*, 2011).

Menurut Luangnarumitchai *et al.* (2007) yang meneliti aktivitas antibakteri dua puluh dua minyak atsiri dari berbagai tanaman pada lima strain tertentu bakteri *P. acnes* di Thailand, ditemukan bahwa minyak sereh (tidak dijelaskan bagian mananya yang digunakan untuk minyak atsiri) adalah salah satu dari lima minyak atsiri yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar.

Berdasarkan uraian di atas, untuk mempertimbangkan kemungkinan aplikasi sereh (*C. citratus*) sebagai antibakteri alami pada pengobatan akne vulgaris, maka diperlukan kajian lebih jauh mengenai aktivitas antibakterinya. Dalam hal ini, bakteri uji yang digunakan adalah *P. acnes*. Penelitian ini akan mempelajari bagaimana aktivitas antibakteri minyak atsiri batang sereh terhadap bakteri *P. acnes* secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

- a. Apakah terdapat aktivitas antibakteri minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes* secara *in vitro*?
- b. Apakah terdapat hubungan antara konsentrasi minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes* secara *in vitro*?
- c. Berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan uraian dan rumusan masalah di atas, maka tujuan dilaksanakannya penelitian ini dimaksudkan untuk:

- a. Mengetahui adanya aktivitas antibakteri minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes* secara *in vitro*.

- b. Mengetahui hubungan antara konsentrasi minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes* secara *in vitro*.
- c. Mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dilaksanakannya penelitian ini antara lain sebagai berikut:

- a. Memberikan informasi dan khasanah ilmu pengetahuan tentang aktivitas antibakteri minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes* bagi para pembacanya.
- b. Memberikan sumbangan pemikiran dan bukti ilmiah bahwa minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) dapat digunakan sebagai terapi antijerawat di masa mendatang.
- c. Sebagai landasan untuk penelitian lebih lanjut baik secara *in vitro*, *in vivo* maupun uji klinis dari minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*).

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Propionibacterium acnes*

2.1.1 Sistem Klasifikasi

Adapun klasifikasi secara ilmiah dari *P. acnes* dapat dilihat pada Tabel 2.1 di bawah ini.

Tabel 2.1 Klasifikasi ilmiah *P. acnes*

Klasifikasi bakteri <i>P. acnes</i>	
Dunia	Bacteria
Filum	Actinobacteria
Kelas	Actinobacteridae
Ordo	Actinomycetales
Famili	Propionibacteriaceae
Genus	<i>Propionibacterium</i>
Species	<i>Propionibacterium acnes</i>

Sumber: (Sugita *et al.*, 2010 dalam Aida, 2014)

2.1.2 Morfologi dan Identifikasi Bakteri

Ciri penting dari *P. acnes* adalah berbentuk batang tak teratur yang terlihat pada pewarnaan gram positif. Bakteri ini dapat tumbuh di udara dan tidak menghasilkan endospora. Bakteri ini dapat berbentuk filamen bercabang atau campuran antara bentuk batang atau filamen dengan bentuk kokoid (Dini, 2010). *P. acnes* dianggap tidak hanya sebagai flora normal pada kulit yang normal tetapi juga bersifat sebagai bakteri patogen fakultatif. Bakteri ini juga dapat diisolasi dari lesi atau luka akne vulgaris (Rusmiyati, Tanpa Tahun). *P. acnes* pada umumnya tumbuh sebagai anaerob obligat, walaupun beberapa strain atau jenis menunjukkan aerotoleran, tetapi tetap menunjukkan pertumbuhan lebih baik sebagai anaerob. Bakteri ini mempunyai kemampuan untuk menghasilkan asam propionat sebagaimana ia mendapatkan

namanya. Bakteri ini juga mempunyai kemampuan itu untuk menghasilkan katalase, indola, dan nitrat. *Propionibacterium* menyerupai *Corynebacterium* secara morfologi dan susunannya, tetapi tidak toksigenik (Dini, 2010).

2.1.3 Patogenesis

Patogenesis jerawat meliputi empat faktor, yaitu hiperproliferasi epidermis folikuler sehingga terjadi sumbatan folikel, produksi sebum berlebihan, inflamasi, dan aktivitas *P. acnes*. Androgen berperan penting pada patogenesis akne tersebut. Akne mulai terjadi saat adrenarke, yaitu saat kelenjar adrenal aktif menghasilkan dihidroepiandrosteron sulfat, prekursor testosteron. Penderita akne memiliki kadar androgen serum dan kadar sebum lebih tinggi dibandingkan dengan orang normal, meskipun kadar androgen serum penderita akne masih dalam batas normal. Androgen akan meningkatkan ukuran kelenjar sebacea dan merangsang produksi sebum. Epitel folikel rambut bagian atas, yaitu infundibulum, menjadi hiperkeratotik dan kohesi keratinosit bertambah sehingga terjadi sumbatan pada muara folikel rambut. Selanjutnya di dalam folikel rambut tersebut terjadi akumulasi keratin, sebum, dan bakteri, dan menyebabkan dilatasi folikel rambut bagian atas, membentuk mikrokomedo. Mikrokomedo yang berisi keratin, sebum, dan bakteri, akan membesar dan ruptur. Selanjutnya, isi mikrokomedo yang keluar akan menimbulkan respons inflamasi. Akan tetapi, terdapat bukti bahwa inflamasi dermis telah terjadi mendahului pembentukan komedo (Movita, 2013).

P. acnes adalah faktor ke empat terjadinya akne. Bakteri gram positif dan anaerob yang merupakan flora normal kelenjar pilosebacea. Remaja dengan akne memiliki konsentrasi *P. acnes* lebih tinggi dibandingkan remaja tanpa akne, tetapi tidak terdapat korelasi antara jumlah *P. acnes* dengan berat akne. Peranan *P. acnes* pada patogenesis akne adalah memecah trigliserida, salah satu komponen sebum, menjadi asam lemak bebas sehingga terjadi kolonisasi *P. acnes* yang memicu

inflamasi. Selain itu, antibodi terhadap antigen dinding sel *P. acnes* meningkatkan respons inflamasi melalui aktivitas komplemen (Movita, 2013).

P. acnes ialah bakteri agen utama etiologi inflamasi jerawat. Ia merangsang pelepasan interleukin-1 (IL-1), IL-8, *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dan mengaktifkan sistem komplemen. Bakteri *P. acnes* menggunakan sebum yang diproduksi di folikel sebagai sumber utama makanan. Dengan menggunakan enzim khusus, bakteri ini menghasilkan asam lemak bebas melalui hidrolisis trigliserida kelenjar sebacea oleh lipasenya. Asam lemak ini dapat mengakibatkan inflamasi jaringan ketika berhubungan dengan sistem imun dan mendukung terjadinya jerawat (Khan, 2009). Selain itu, *P. acnes* menghasilkan enzim ekstraseluler, seperti protease, yang dapat berpartisipasi dalam inflamasi oleh kerusakan matriks dan pelepasan proteolitik oleh keratinosit folikel (Li *et al.*, 2014).

Bakteri ini dapat juga menyebabkan blepharitis dan endophthalmitis kronis bahkan sering sekali diikuti dengan operasi atau pembedahan intraokular. Genom dari bakteri ini dirangkai dan penelitian dari genom bakteri ini menunjukkan beberapa gen yang dapat menghasilkan enzim-enzim untuk menurunkan kondisi kulit dan protein-protein yang mungkin *immunogenic* (sistem kekebalan aktif) (Rosyad, 2009).

2.1.4 Manifestasi Klinis

Akne vulgaris paling banyak terjadi di wajah, tetapi dapat terjadi pada punggung, dada, dan bahu. Di badan, akne cenderung terkonsentrasi dekat garis tengah tubuh. Penyakit ini ditandai oleh lesi yang bervariasi, meskipun satu jenis lesi biasanya lebih mendominasi. Lesi non-inflamasi, yaitu komedo dapat berupa komedo terbuka (*blackhead comedones*) yang terjadi akibat oksidasi melanin, atau komedo tertutup (*whitehead comedones*). Lesi inflamasi berupa papul, pustul, hingga nodul dan kista. Skar atau jaringan parut dapat menjadi komplikasi akne non-inflamasi maupun akne inflamasi. Derajat akne berdasarkan tipe dan jumlah lesi dapat digolongkan menjadi ringan, sedang, berat, dan sangat berat (Movita, 2013).

2.1 5 Pengobatan

Antibiotik sudah secara luas digunakan sebagai salah satu cara efektif dalam pengobatan akne vulgaris selama tiga puluh tahun terakhir. Terapi antibiotik tidak hanya menurunkan jumlah *P. acnes* pada kulit, tetapi juga bekerja dengan menurunkan jumlah mediator inflamasi. Saat ini, klindamisin adalah salah satu antibiotik yang paling sering digunakan dalam pengobatan akne vulgaris. Selain itu, tetrasiklin dan eritromisin juga banyak digunakan untuk akne inflamasi. Meskipun tidak mengurangi produksi sebum tetapi dapat menurunkan konsentrasi asam lemak bebas dan menekan pertumbuhan *P. acnes*. Akan tetapi tetrasiklin dan eritromisin tidak banyak digunakan lagi karena angka resistensi *P. acnes* yang cukup tinggi (Nugroho, 2013).

2.2 Sereh (*Cymbopogon citratus*)

2.2.1 Sistem Klasifikasi

Adapun klasifikasi sereh secara ilmiah dapat dilihat pada Tabel 2.2 di bawah ini.

Tabel 2.2 Klasifikasi ilmiah sereh (*C. citratus*)

Klasifikasi sereh (<i>C. citratus</i>)	
Kingdom	Plantae
Subkingdom	Trachebionta
Divisi	Spermatophyta
Sub Divisi	Angiospermae/Magnoliophyta
Kelas	Monocotyledonae/liliopsida
Sub Kelas	Commelinidae
Ordo	Poales/Cyperales
Famili	Graminae/Poaceae
Genus	<i>Cymbopogon</i>
Spesies	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf

Sumber: (Kristiani, 2013 dan LIPI, 2015)

2.2.2 Deskripsi Tanaman Sereh

Tanaman sereh termasuk rumput-rumputan tegak menahun, serta perakarannya sangat dalam dan kuat. Batangnya tegak atau condong, membentuk rumpun, pendek, masif, bulat (silindris), gundul, sering kali di bawah buku-bukunya berlilin, dan penampang lintang batang berwarna merah. Daunnya tunggal, lengkap, pelepah daun silindris, gundul, sering kali bagian permukaan dalam berwarna merah, ujung berlidah (ligula), helaiannya lebih dari separuh menggantung dan hasil berbau aromatik. Bunganya merupakan susunan malai atau bulir majemuk, bertangkai atau duduk, berdaun pelindung nyata, dan biasanya berwarna sama (umumnya putih). Daun pelindung bermetamorfosis menjadi gluma steril dan fertil (pendukung bunga). Kelopak bunga bermetamorfosis menjadi bagian palea (dua unit) dan *lemma* atau sekam (satu unit). Mahkota bunga bermetamorfosis menjadi dua kelenjar *lodricula*, yang berfungsi untuk membuka bunga di pagi hari. Benang sari berjumlah tiga sampai enam buah dan membuka secara memanjang. Sementara itu, kepala putiknya yang sepasang membentuk bulu dengan percabangan berbentuk jambul. Buah sereh seperti buah padi, memanjang, pipih dorso ventral, embrio separuh bagian biji. Waktu berbunga antara bulan Januari–Desember (Prasetyono, 2012).

Tanaman ini seperti yang bisa dilihat pada Gambar 2.1, biasa tumbuh pada daerah dengan ketinggian 50–2.700 meter di atas permukaan laut. Di Sri Lanka, tanaman ini tumbuh alami, namun dapat ditanam pada berbagai kondisi tanah di daerah tropis yang lembab, cukup sinar matahari, dan dengan curah hujan yang relatif tinggi. Di Indonesia, tanaman ini banyak terdapat di Jawa, di dataran rendah dengan ketinggian 60–140 meter di atas permukaan laut. Perbanyakan tanaman ini dapat dilakukan dengan menggunakan potongan rimpangnya. Jarak tanam yang dianjurkan adalah 0,5–1 meter. Pemanenan dilakukan bila tinggi tanaman telah mencapai 1–1,5 meter. Pemotongan pertama dilakukan pada umur enam sampai sembilan bulan. Pemanenan selanjutnya dilakukan selang tiga sampai empat bulan (Prasetyono, 2012).



Gambar 2.1 Tanaman sereh atau *C. citratus* (Sumber: *Rare and Exotic Seed*, 2015)

2.2.3 Penggunaan Tanaman Sereh

Masyarakat telah sejak lama menggunakan tanaman sereh (*C. citratus*) sebagai bahan makanan ataupun obat tradisional. Sereh digunakan sebagai obat tradisional untuk batuk, *elephantiasis*, flu, gingivitis, sakit kepala, lepra, malaria, sakit mata, pneumonia, dan gangguan vaskuler. Jika dicampur dengan lada, sereh bisa dijadikan terapi rumahan untuk gangguan menstruasi dan nausea. Selain itu, tumbuhan ini juga dapat menjadi pembersih yang baik untuk mendetoks liver, pankreas, ginjal, kandung kemih (*vesica urinaria*), dan traktus digestivus. Sereh juga dapat mengatasi asam urat, kolesterol, lemak berlebih, dan toksin lain di dalam tubuh saat stimulasi pencernaan, sirkulasi darah, dan laktasi; meredakan gangguan pencernaan dan gastroenteritis; menurunkan tekanan darah. Reser terbaru dari *Food and Nutrition Research Institute of the department of Science and technology* menunjukkan bahwa sereh dapat membantu mencegah kanker (Manvitha dan Bidya, 2014).

2.3 Fitokimia Minyak Atsiri Batang Sereh

Tidak satupun minyak atsiri tersusun dari senyawa tunggal, tetapi merupakan campuran komponen yang terdiri atas tipe-tipe yang berbeda. Melalui asal-usul biosintetiknya, minyak atsiri secara umum dapat dibedakan menjadi dua yaitu, turunan terpenoid yang terbentuk melalui jalur biosintesis asam asetat mevalonat dan turunan fenil propanoid yang merupakan senyawa aromatik, terbentuk melalui jalur biosintesis asam sikimat. Terpenoid berasal dari suatu unit senyawa sederhana yang disebut sebagai isoprena. Sementara fenil propana terdiri dari gabungan inti benzena (Gunawan, 2010).

Penyusun minyak atsiri dari kelompok terpenoid dapat berupa terpena-terpena. Terpena yang paling sering terdapat sebagai komponen penyusun minyak atsiri adalah monoterpena. Sebagai contoh adalah geraniol (asiklik monoterpena), limonena (monosiklik monoterpena), dan α -pinena (bisiklik monoterpena). Terpena lain di bawah monoterpena yang berperan penting sebagai penyusun minyak atsiri adalah seskuiterpena dan diterpena. Sebagai contoh adalah kadinena (bisiklik seskuiterpena), β -kariofilena (bisiklik seskuiterpena), dan asam abietat (trisiklik seskuiterpena) (Gunawan, 2010). Aktivitasnya yang menghambat bakteri dimungkinkan karena kemampuannya untuk berikatan dengan protein ekstraseluler dan dinding sel bakteri. Semakin bersifat lipofilik, maka semakin dia melakukan disrupsi terhadap membran sel bakteri. Mekanisme penghambatannya diduga melalui perusakan lipid bilayer membran sel akibat gugus hidrofobik yang dimilikinya (Putra, 2014).

Kelompok besar lain dari komponen penyusun minyak atsiri adalah senyawa golongan fenil propana. Senyawa ini mengandung cincin fenil C_6 dengan rantai samping berupa propana C_3 . Sebagai contoh senyawa golongan fenil ini adalah sinamilaldehida, anetol, eugenol, feniletil, anisalaldehida, dan metil salisilat (Gunawan, 2010). Sifat daya hambat senyawa fenol terhadap mikroba disebabkan karena gugus hidroksil yang dimilikinya dapat berinteraksi dengan protein membran sel mikroba melalui ikatan hidrogen sehingga protein tersebut kehilangan fungsinya. Gugus

hidroksil dapat menjadi donor hidrogen yang sangat baik untuk membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karbonil pada protein. Protein dan fosfolipid merupakan senyawa penting yang menyusun membran sel mikroba, yang mana protein di sini berfungsi sebagai pengatur keluar-masuknya material dari dan ke dalam sel (Putra, 2014).

Tabel 2.3 Komponen dan persentase minyak atsiri batang *C. citratus*

Komponen	Persentase
geranial	48,1%
neral	34,6%
<i>myrcene</i>	11,0%
lainnya	6,3%

Sumber: (Bassolé *et al.*, 2011)

Menurut Bassolé *et al.* (2011), komponen terbesar minyak atsiri *C. citratus* berupa sitral (siklik monoterpena) yang merupakan campuran dari dua stereoisomer aldehida monoterpena, yaitu trans isomer geranial (*alpha-citral*) dan cis isomer neral (*beta-citral*). Ia juga tersusun atas kandungan lain diantaranya *myrcene*, *ocimene*, *linalool*, *citronella*, geraniol, nerol, *farnasene*, *chamigrene*, *naphtalene*, dan lainnya (Subramanian *et al.*, 2015). Kemudian ditemukan juga *pinene*, borneol, *terpinolene*, dan lainnya (Shah *et al.*, 2011). Hasil pengujian komponen minyak atsiri *C. citratus* dapat dilihat pada Tabel 2.3 di atas.

Menurut Bakkali *et al.* (dalam Korenblum *et al.*, 2013) mekanisme kerja minyak atsiri dalam membunuh bakteri adalah dengan cara mengubah permeabilitas membran sel, menghilangkan ion-ion dalam sel, menghalangi proton-*pump*, dan menurunkan produksi adenosin trifosfat (ATP). Minyak atsiri bersifat lipofilik yang dapat melewati dinding bakteri karena dinding bakteri terdiri atas polisakarida, asam lemak, dan fosfolipid. Hal ini dapat mengakibatkan kerusakan dinding sel sehingga dapat membunuh bakteri. Mekanisme kerja minyak atsiri adalah dengan menghambat stabilitas membran sel bakteri dan menyebabkan material sitoplasma menghilang.

Adesegun *et al.* (2013) menyatakan bahwa minyak atsiri *C. citratus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. sonnei* dengan cara menjadi inhibitor kompetitif enzim protease ekstraseluler bakteri *S. sonnei* dikarenakan adanya gugus prostetik ion logam seperti Hg^{2+} , CO^{2+} , dan Ba^{2+} pada minyak atsiri.

2.4 Antibakteri

Antibakteri adalah obat pembasmi bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Dalam hal ini yang dimaksudkan dengan bakteri terbatas pada jasad renik yang tidak termasuk kelompok parasit, virus, atau jamur. Antibakteri harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, artinya obat harus bersifat sangat toksik untuk bakteri, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes. Berdasarkan toksisitas selektif, antibakteri dibedakan menjadi dua, yaitu antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan (bakteriostatik) dan antibakteri yang bersifat membunuh bakteri (bakterisid). Sementara itu, berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi dalam lima kelompok (Setiabudy, 2011).

2.4.1 Menghambat Metabolisme Sel Bakteri

Antibakteri yang masuk dalam kelompok ini adalah sulfonamid, trimetoprim, asam p-aminosalisilat (PAS) dan sulfon. Dengan mekanisme kerja ini diperoleh efek bakteriostatik. Asam folat dibutuhkan bakteri untuk kelangsungan hidupnya. Dalam hal ini bakteri patogen harus dapat mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA). Apabila antibakteri menang bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya kehidupan bakteri akan terganggu (Setiabudy, 2011).

2.4.2 Menghambat Sintesis Dinding Sel Bakteri

Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah penisilin, sefalosporin, basitrasin, vankomisin, dan sikloserin. Dinding sel bakteri, terdiri atas polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Antibakteri akan menghambat reaksi yang paling dini dalam proses sintesis dinding sel. Oleh karena tekanan osmotik dalam sel bakteri lebih daripada di luar sel maka kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis, yang merupakan dasar efek bakterisidal pada bakteri yang peka (Setiabudy, 2011).

2.4.3 Mengganggu Keutuhan Membran Sel Bakteri

Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah polimiksin, golongan polien serta berbagai antibakteri kemoterapeutik, umpamanya antiseptik *surface active agents*. Polimiksin sebagai senyawa ammonium-kuartener dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel bakteri. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen dalam sel bakteri (Setiabudy, 2011).

2.4.4 Menghambat Sintesis Protein Sel Bakteri

Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah golongan aminoglikosida, makrolid, linkomisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol. Untuk kehidupannya, sel bakteri perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua subunit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan cara terikatnya salah satu komponen ribosom dengan antibakteri. Akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel bakteri (Setiabudy, 2011).

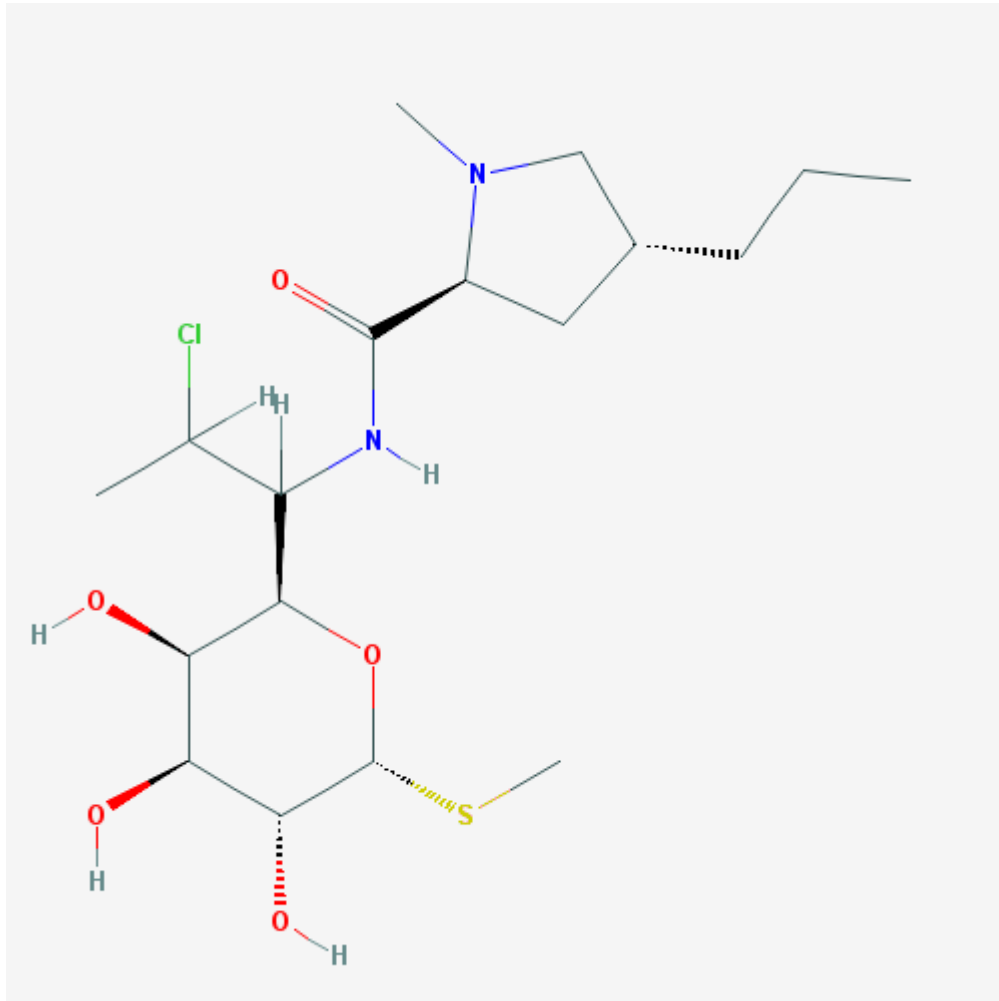
2.4.5 Menghambat Sintesis Asam Nukleat Sel Bakteri

Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah rifampisin, dan golongan kuinolon. Antibakteri akan berikatan dengan enzim RNA-polimerase sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut (Setiabudy, 2011).

2.5 Klindamisin

Klindamisin adalah antibakteri turunan asam amino, yaitu asam trans-L-4-n-proilhigrinat, yang terikat pada turunan oktosa yang mengandung sulfur dengan nama kimia $C_{18}H_{33}ClN_2O_5S$ (Pubchem, 2015). Klindamisin berikatan secara eksklusif pada subunit 50S ribosom bakteri dan menekan sintesis protein. Umumnya, klindamisin serupa dengan eritromisin dalam hal aktivitasnya secara *in vitro* terhadap galur-galur rentan pneumokokus, *Streptococcus pyogenes*, dan *S. viridans*. Klindamisin hampir seluruhnya diabsorpsi setelah pemberian oral. Selain itu, obat ini terdistribusi luas dalam banyak cairan dan jaringan, termasuk tulang. Hanya sekitar 10% dari obat ini yang diberikan diekskresikan dalam bentuk tidak berubah di urin dan sejumlah kecil ditemukan dalam feses. Dosis oral untuk dewasa adaah 150–300 mg setiap 6 jam. Klindamisin berhasil digunakan dalam kombinasi dengan aminoglikosida untuk infeksi akibat kontaminasi feses (abses pada intraabdomen atau pelvis dan peritonitis). Efek sampingnya adalah diare dan ruam kulit pada pasien HIV (Gilman, 2007).

Klindamisin. Klindamisin berguna sebagai antibiotik oral untuk terapi akne, tetapi antibiotik ini banyak digunakan dalam bentuk topikal. Dosis awal 150 mg, tiga kali sehari. Efek samping utama berupa infeksi intestinal yang dinamakan kolitis pseudomembran yang disebabkan oleh bakteri (Zulfitriah, 2012).



Gambar 2.2 Struktur kimia klindamisin (Sumber: Pubchem, 2015)

2.6 Uji Sensitivitas Terhadap Antibiotik

Ada dua macam metode untuk uji sensitivitas, yaitu metode difusi dan metode dilusi. Uji ini dikembangkan untuk menemukan kemampuan menghambat beberapa galur bakteri dengan satu jenis antibiotik (Brander *et al.*, dalam Wasitaningrum, 2009).

2.6.1 Difusi

Media difusi menggunakan kertas disk yang berisi antibiotik dan telah diketahui konsentrasinya. Pada metode difusi, media yang dipakai adalah *Mueller Hinton Agar*. Ada beberapa cara pada metode difusi, yaitu:

a. Cara *Kirby-Bauer*

Cara *Kirby-Bauer* merupakan suatu metode uji sensitivitas bakteri yang dilakukan dengan membuat suspensi bakteri pada media *Brain Heart Infusion (BHI)* cair dari koloni pertumbuhan kuman 24 jam. Selanjutnya disuspensikan dalam 0,5 ml BHI cair (diinkubasi 4–8 jam pada suhu 37° C). Hasil inkubasi bakteri diencerkan sampai sesuai dengan standar konsentrasi kuman 10⁹ CFU/ml (CFU = Colony Forming Unit). Suspensi bakteri diuji sensitivitas dengan meratakan suspensi bakteri tersebut pada permukaan media agar. Cakram antibiotik diletakan di atas media tersebut dan kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 19–24 jam, kemudian dibaca hasilnya (Wasitaningrum, 2009).

Zona hambat dibagi menjadi zona radikal dan iradikal. Zona radikal merupakan suatu daerah di sekitar cakram yang sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Potensi antibiotik diukur dengan mengukur diameter zona radikal. Sementara itu, zona iradikal adalah suatu daerah di sekitar cakram yang menunjukkan pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibiotik tersebut. Di zona iradikal ini akan terlihat adanya pertumbuhan kurang subur atau lebih jarang dibanding dengan daerah di luar pengaruh antibiotik tersebut (Wasitaningrum, 2009).

b. Cara sumuran

Suspensi bakteri 10⁸ CFU/ml diratakan pada media agar, kemudian agar tersebut dibuat sumuran dengan garis tengah tertentu menurut kebutuhan. Larutan antibiotik yang digunakan ditetaskan ke dalam sumuran. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C selama 18–24 jam, kemudian dibaca hasilnya sama seperti cara *Kirby-Bauer* (Wasitaningrum, 2009).

c. *Cara Pour Plate*

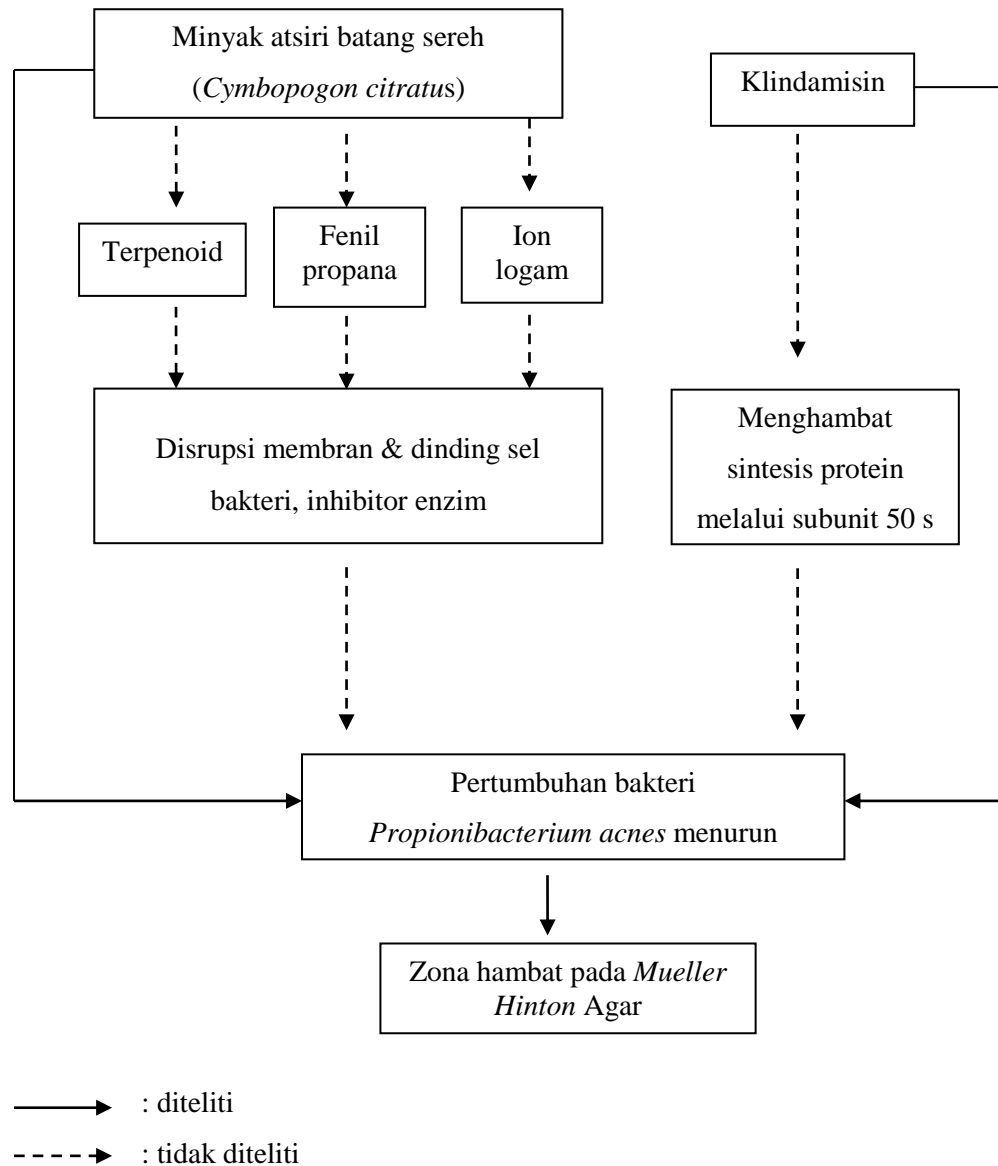
Setelah dibuat suspensi kuman dengan larutan BHI sampai konsentrasi standar 10^8 CFU/ml, kemudian diambil satu mata ose dan dimasukkan ke dalam 4 ml agar base 1,5% dengan temperatur 50° C. Suspensi kuman tersebut dibuat homogen dan dituang pada media agar *Mueller Hinton*. Setelah beku, dipasang cakram antibiotik (diinkubasi 15–20 jam pada suhu 37° C) dibaca dan dibersihkan dengan standar masing-masing antibiotik (Wasitaningrum, 2009).

2.6.2 Dilusi

Pada metode dilusi, substansi antibakteri dalam kadar bertingkat dicampur ke dalam medium bakteriologis solid atau cair. Biasanya digunakan substansi antibakteri dengan pengenceran dua kali lipat. Medium kemudian diinokulasi dengan bakteri penguji dan diinkubasi (Wasitaningrum, 2009).

Metode dilusi ada dua macam, yaitu metode dilusi cair dan metode dilusi padat. Pada metode dilusi cair, masing-masing konsentrasi obat ditambah suspensi kuman atau bakteri dalam media. Berbeda dengan dilusi cair, metode dilusi padat tiap konsentrasi obat dicampur dengan media agar, lalu ditanami bakteri. Pertumbuhan bakteri ditandai oleh adanya kekeruhan setelah 16–20 jam diinkubasi. Konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan dan disebut dengan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM). Masing-masing konsentrasi antibiotik yang menunjukkan hambatan pertumbuhan ditanam pada agar padat media pertumbuhan bakteri dan diinkubasi. Konsentrasi terendah dari antibiotik yang membunuh 99,9% inokulum bakteri disebut Konsentrasi Bakterisid Minimal (Brander *et al.*, dalam Wasitaningrum, 2009).

2.7 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.4 Skema kerangka konsep penelitian

Pada penelitian ini, bagian yang diteliti adalah bagaimana aktivitas minyak atsiri batang sereh terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes* yang ditunjuk oleh tanda panah tanpa terputus pada Gambar 2.4 sehingga pertumbuhannya bisa dilihat pada zona hambat di *Mueller Hinton* Agar. Sementara, proses bagaimana minyak atsiri

bisa menghambat pertumbuhan bakteri yaitu terpenoid dan fenil propana yang mendisrupsi membran sel bakteri juga inhibitor enzim protease ekstraseluler oleh garam ion logam tidak diteliti. Ini ditunjukkan dengan tanda anak panah terputus. Kemudian penelitian ini juga meneliti bagaimana aktivitas klindamisin sebagai kontrol positif dalam menghambat pertumbuhan *P. acnes*, tetapi prosesnya yaitu bagaimana zat ini menghambat sintesis protein 50S tidak diteliti.

2.8 Hipotesis

- a. Terdapat aktivitas antibakteri minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes*.
- b. Ditemukan hubungan yang bermakna antara konsentrasi minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes*.
- c. Ditemukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

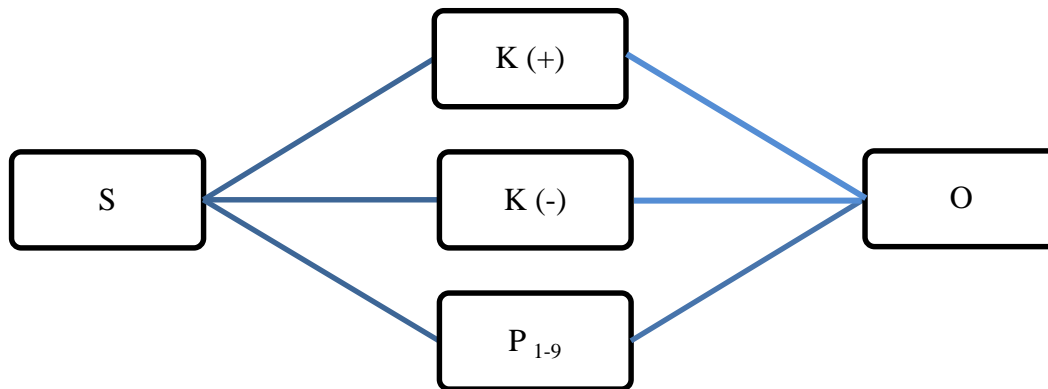
Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen atau percobaan (*experiment research*), yaitu kegiatan percobaan (*experiment*), yang bertujuan untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang timbul, sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu. Ciri khusus dari penelitian eksperimen adalah adanya percobaan atau *trial*. Percobaan itu berupa perlakuan atau intervensi terhadap suatu variabel. Dari perlakuan tersebut diharapkan terjadi perubahan atau pengaruh terhadap variabel yang lain (Notoatmodjo, 2010).

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *quasi experimental* atau eksperimen semu yang dilaksanakan untuk mengetahui efek pemberian minyak atsiri batang sereh (*C. Citratus*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. acnes*. Pada perlakuan ini, peneliti tidak mempunyai pembatasan yang ketat terhadap randomisasi (Notoatmodjo, 2010).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan eksperimental *Post test only Control Group Design* (Notoatmodjo, 2010). *Post test* yang dimaksud di sini adalah pada tahap observasi yaitu tahap pengujian sumuran untuk menentukan KHM. Rancangan penelitian dapat dilihat pada skema Gambar 3.1 di bawah ini.



- S : Sampel *P. acnes* yang sudah disesuaikan dengan standar 0,5 Mc Farland
 K(+) : Kontrol positif berupa klindamisin 20 µg/ml aquades
 K(-) : Kontrol negatif berupa *tween-80* yang tidak diberi perlakuan pemberian minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*)
 P(1-9): Kelompok perlakuan 1-9 dengan minyak atsiri konsentrasi 10 µl/ml, 30 µl/ml, 50 µl/ml, 60 µl/ml, 70 µl/ml, 85 µl/ml, 100 µl/ml, 150 µl/ml dan 175 µl/ml *tween-80*.
 O : Observasi hasil data perlakuan

Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

3.3 Metode Uji Kepekaan Bakteri

Metode yang digunakan untuk uji konsentrasi hambat minimum bakteri *P. acnes* adalah dengan metode difusi sumuran. Media agar *Mueller Hinton* (MH) digunakan sebagai media bakteri *P. acnes* untuk uji KHM (Wasitaningrum, 2009).

3.4 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah koloni bakteri *P. acnes* dari *stock culture* milik Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang disesuaikan dengan standar 0,5 Mc Farland (10^8 CFU/ml).

Pada uji penelitian dilakukan percobaan ulang dengan kelompok perlakuan yang sama seperti di atas sebanyak n kali. Ulangan ini didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus Federer (Aida, 2014).

Banyaknya ulangan:

$$(n - 1) (t - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) (11-1) \geq 15$$

$$(n - 1) 9 \geq 15$$

$$n - 1 \geq 1,67$$

$$n \geq 2,67$$

Keterangan:

n = besar ulangan

t = jumlah kelompok perlakuan

Pada penelitian ini terdapat 11 kelompok perlakuan.

Dari perhitungan di atas, akan dilakukan percobaan ulangan uji penelitian sebanyak tiga kali.

3.5 Tempat dan Waktu Penelitian

3.5.1 Tempat Penelitian

Pengujian identifikasi sampel tanaman sereh (*C. citratus*) dilakukan di LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia), Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur. Destilasi dan pembuatan reagen sereh dilakukan di Laboratorium RPHP (Rekayasa Proses Hasil Pertanian) FTP (Fakultas Teknologi Pertanian) Universitas Jember. Uji aktivitas antibakteri terhadap *P. acnes* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini mulai dari pengujian sampel sereh sampai dengan pengujian aktivitas antibakteri dilaksanakan pada bulan Oktober sampai Desember 2015.

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini berupa minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*) konsentrasi 10 µl/ml, 30 µl/ml, 50 µl/ml, 60 µl/ml, 70 µl/ml, 85 µl/ml, 100 µl/ml, 150 µl/ml, dan 175 µl/ml *tween-80*.

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona hambat minyak atsiri batang sereh terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes*.

3.7 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah suatu definisi yang diberikan kepada suatu variabel atau konstruk dengan cara memberikan arti, atau menspesifikasikan kegiatan, ataupun memberikan suatu operasional yang diperlukan untuk mengukur konstruk atau variabel tersebut (Nazir, 2011). Semua definisi operasional yang digunakan peneliti mempunyai jenis data skala rasio.

3.7.1 Konsentrasi Minyak Atsiri

Konsentrasi minyak atsiri adalah banyaknya minyak atsiri dalam suatu suspensi. Pembuatan konsentrasi 10 µl/ml *tween-80* dilakukan dengan cara mengambil 10 µl minyak atsiri dan dilarutkan dengan surfaktan *tween-80* sebanyak 1 ml. Pembuatan konsentrasi 30 µl/ml *tween-80* dilakukan dengan cara mengambil 30 µl minyak atsiri dan dilarutkan dengan surfaktan *tween-80* sebanyak 1 ml. Pembuatan konsentrasi 50 µl/ml *tween-80* dilakukan dengan cara mengambil 50 µl minyak atsiri dan dilarutkan dengan surfaktan *tween-80* sebanyak 1 ml. Begitu seterusnya sampai konsentrasi tertinggi yaitu 175 µl/ml *tween-80*, dilakukan dengan cara mengambil 175 µl minyak atsiri dan dilarutkan dengan surfaktan *tween-80* sebanyak

1 ml. Masing-masing konsentrasi divortex selama 1 menit, kemudian volume minyak atsiri yang dimasukkan ke dalam tiap sumuran adalah 100 μ l.

3.7.2 Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terkecil dari minyak atsiri *C. citratus* yang masih bisa menghambat pertumbuhan bakteri *P. acnes* secara *in vitro*. Cara pengukuran KHM adalah dengan mengukur zona hambat terkecil dari sumuran yang telah diberi perlakuan.

3.7.3 Pertumbuhan bakteri *P. acnes*

Pertumbuhan bakteri *P. acnes* adalah koloni bakteri yang terlihat setelah diinkubasi. Pertumbuhan bakteri diukur secara kualitatif dengan melihat kekeruhan pada media agar *Mueller Hinton* yang pada saat sebelum diinokulasi sudah disesuaikan dengan standar 0,5 *Mc Farland* dan kemudian diinkubasi secara anaerob selama 24 jam.

3.7.4 Diameter Zona Hambat

Diameter zona hambat merupakan diameter lingkaran jernih yang terbentuk di sekitar sumuran dan terjadi akibat aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *P. acnes*. Diameter diukur dalam satuan milimeter menggunakan jangka sorong.

3.8 Alat dan Bahan

3.8.1 Alat

Alat alat yang digunakan adalah satu set alat destilasi, cawan petri diameter 10 cm, ose bulat, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *beaker glass*, mikropipet, tip, jangka sorong, standar 0,5 *Mc. Farland*, autoklaf, spiritus, masker, *handscoon*, tisu gulung, sterilisator, inkubator, vial, vortex, tabung erlenmeyer, tabung logam pencetak sumuran, kapas lidi, spuit, bunsen, timbangan, dan kompor listrik.

3.8.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah minyak atsiri yang diambil dari batang sereh dalam beberapa konsentrasi, biakan bakteri *P. acnes*, media *Mueller Hinton*, aquades steril, aquades biomol 5 L, alkohol, klindamisin, spiritus 1 L, dan *tween-80* sebanyak 20 ml.

3.9 Prosedur Penelitian

3.9.1 Uji Identifikasi Tanaman

Tanaman sereh (*C. citratus*) yang digunakan untuk penelitian ini mendapatkan surat keterangan identifikasi tanaman (Lampiran I) dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur.

3.9.2 Persiapan Alat

Semua alat yang akan dipakai dalam penelitian ini dicuci bersih, kemudian dikeringkan dan disterilkan dalam sterilisator panas kering selama 15 menit dengan suhu 110° C. Bahan media agar *Mueller Hinton* disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121° C (Suswati dkk., 2011).

3.9.3 Penyediaan Minyak Atsiri Batang Sereh (*C. citratus*)

Penyediaan minyak atsiri sereh dilakukan dengan metode penyulingan (destilasi uap). Langkah pertama yang dilakukan adalah penyediaan bahan, dalam hal ini bahan utamanya adalah batang semu sereh dalam keadaan segar. Adapun cara pembuatan minyak atsiri batang sereh ini adalah sebagai berikut.

Batang semu sereh dapur ditimbang terlebih dahulu sebanyak 3,6 kg. Setelah ditimbang, batang sereh tersebut kemudian dipotong potong sepanjang kira kira 3 cm. Kemudian siapkan alat destilasi minyak atsiri. Tabung alat destilasi diisi air kurang lebih tujuh liter (3/4 dari bawah sampai ke batas loyang). Batang dimasukkan pada tabung lalu tabung ditutup rapat, jangan sampai ada baut yang kendur agar tidak

bocor. Tabung dihubungkan dengan alat destilasi yang terbuat dari kaca, kemudian pendingin balik dihubungkan ke alat destilasi. Pendingin balik dialiri air kran secara terus menerus sampai destilasi selesai. Kompor gas dihubungkan ke tabung dan dihidupkan serta diatur besar kecilnya api pemanasan. Alat destilasi ditunggu selama lima jam untuk menghasilkan minyak atsiri. Setelah lima jam, pemanas dimatikan dan ditunggu sepuluh menit agar destilat minyak atsiri yang dihasilkan menjadi dingin. Destilat ditampung dalam corong pemisah dan dipisahkan minyak dari air, kemudian minyak tersebut ditampung di botol penyimpanan dan disimpan dalam mesin pendingin untuk mendapatkan minyak yang bebas dari air (Feriyanto, 2013).

Destilasi atau penyulingan merupakan proses pemisahan komponen berupa cairan maupun padatan berdasarkan perbedaan titik uap. Proses ini dilakukan terhadap minyak atsiri yang tidak larut dalam air. Kelebihan destilasi uap yaitu dapat memisahkan zat dengan perbedaan titik didih yang tinggi sehingga produk yang dihasilkan benar-benar murni. Namun, destilasi uap memiliki kekurangan yaitu hanya dapat memisahkan zat yang memiliki perbedaan titik didih besar (Kadarohman, 2011).

3.9.4 Pembuatan Media *Mueller Hinton*

Media agar *Mueller Hinton* ditimbang sebanyak 34 gram dilarutkan dalam aquades steril sebanyak 1 L dengan cara dididihkan. Setelah larut, disterilkan dengan autoklaf suhu 121° C selama 15 menit. Larutan dituang ke dalam cawan petri steril sampai ketebalan 9 mm (volume ± 25 ml) dan ditutup lalu dibiarkan sampai memadat di suhu ruangan (Kumalasari, 2014).

3.9.5 Pembuatan Larutan Standar 0,5 Mc *Farland*

Sebanyak 16 μ l (BaCl_2) 1% dicampurkan dengan (H_2SO_4) 1% sebanyak 3,3 μ l kemudian divortex selama 60 detik sehingga tercampur merata (Suswati dkk., 2011).

3.9.6 Pembuatan Suspensi Bakteri

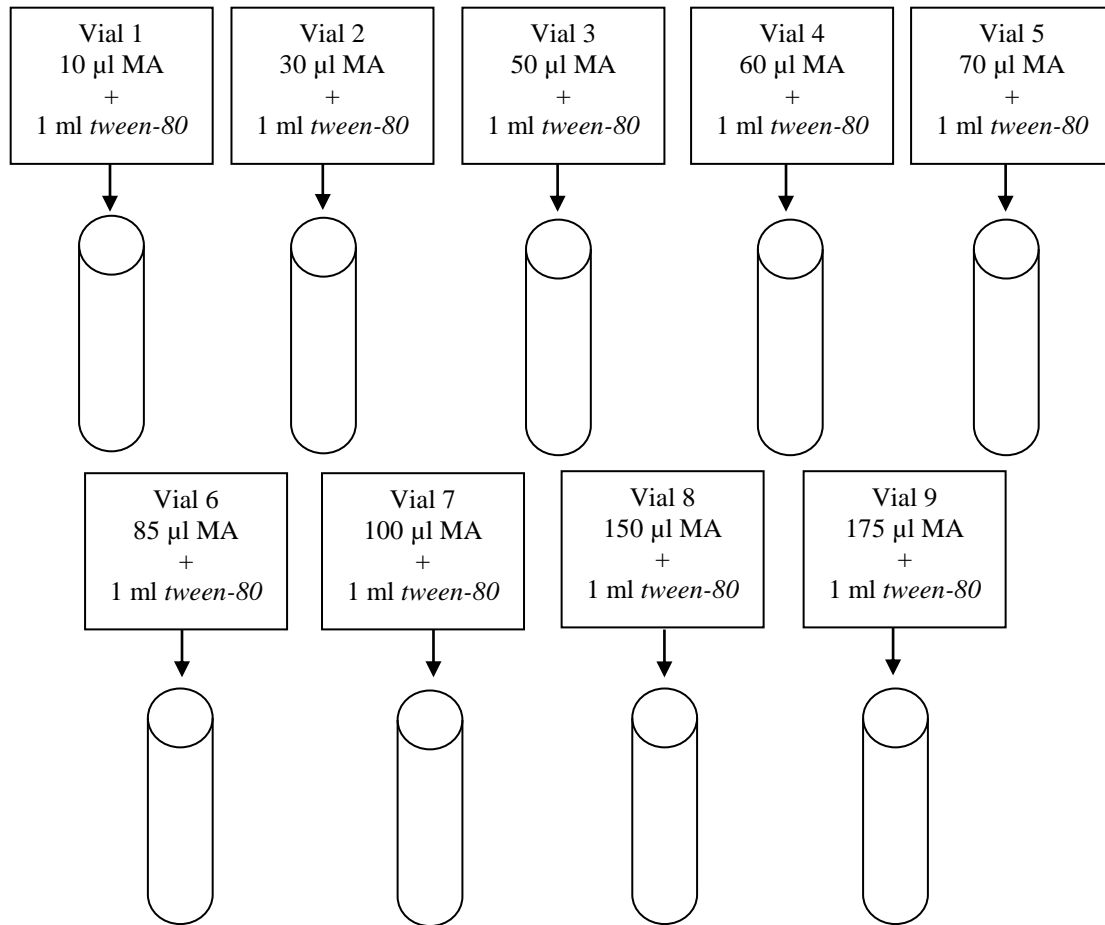
Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *P. acnes* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Bakteri yang dipergunakan dibuat dengan mengambil satu ose kuman dari kultur, kemudian dimasukkan ke dalam aquades steril hingga mencapai kekeruhan yang ekuivalen dan disesuaikan dengan larutan standar 0,5 *Mc Farland* (1×10^8 CFU/ml) (Suswati dkk., 2011).

3.9.7 Inokulasi Bakteri dan Pembuatan Sumuran

Suspensi bakteri yang sudah dibuat dioleskan pada cawan petri berisi agar *Mueller Hinton* (MH) agar menggunakan lidi kapas steril sebanyak 4 kali. Setelah kering, dibuat 4 sumuran menggunakan aluminium steril (tabung logam pencetak sumuran) berdiameter $\pm 7,6$ mm pada masing-masing cawan (Suswati dkk., 2011).

3.9.8 Pembuatan Konsentrasi Minyak Atsiri

Pembuatan konsentrasi ini didasarkan atas penelitian sebelumnya dan terutama uji pendahuluan. Dari situ, Peneliti menyiapkan 9 konsentrasi yaitu vial 1 sampai vial 9. Pada masing-masing vial diisi larutan surfaktan *tween-80* sebanyak 1 ml (Feriyanto, 2013). Setelah itu, ditambahkan volume minyak atsiri sesuai yang dikehendaki. Peneliti memberi 10 $\mu\text{l/ml}$ pada vial 1, 30 $\mu\text{l/ml}$ pada vial 2, 50 $\mu\text{l/ml}$ pada vial 3, 60 $\mu\text{l/ml}$ pada vial 4, 70 $\mu\text{l/ml}$ pada vial 5, 85 $\mu\text{l/ml}$ pada vial 6, 100 $\mu\text{l/ml}$ pada vial 7, 150 $\mu\text{l/ml}$ pada vial 8, dan 175 $\mu\text{l/ml}$ pada vial 9. Pengenceran minyak atsiri dapat dilihat pada skema Gambar 3.2 di bawah ini.



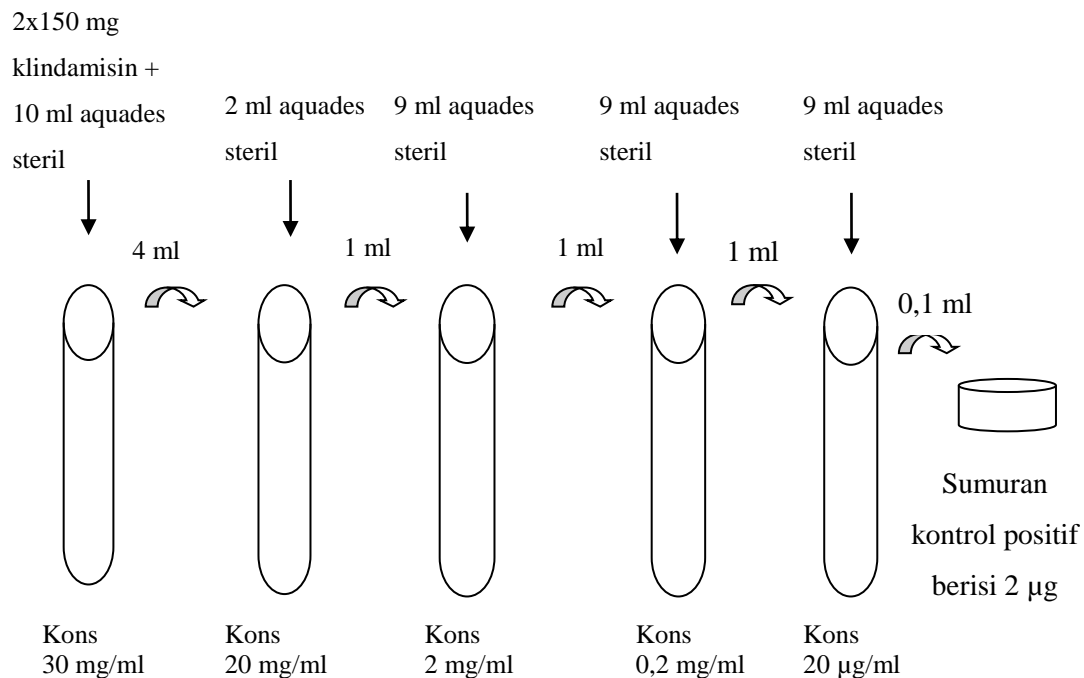
MA : Minyak Atsiri

Gambar 3.2 Skema pengenceran minyak atsiri batang sereh (*C. citratus*)

Selanjutnya, masing masing vial divortex selama 60 detik agar suspensi tercampur. Kemudian masing-masing suspensi dimasukkan ke dalam sumuran dengan menggunakan mikropipet sehingga volume suspensi yang masuk adalah 100 µl ke dalam tiap sumuran.

3.9.9 Pembuatan Suspensi Antibiotik

Menurut CLSI (2012), kebutuhan klindamisin adalah $2 \mu\text{g}$ tiap *disk*/sumuran pada metode difusi sehingga kapsul berisi 150 mg klindamisin dilarutkan dengan aquades steril dan dilakukan pengenceran sedemikian rupa yang bisa dilihat pada skema di bawah hingga didapatkan konsentrasi $20 \mu\text{g/ml}$. Karena dalam satu sumuran dapat memuat volume 0,1 ml, maka $2 \mu\text{g}$ klindamisin dapat masuk ke dalam sumuran.



Kons : Konsentrasi

Gambar 3.3 Skema pengenceran antibiotik klindamisin

3.9.10 Inkubasi Bakteri

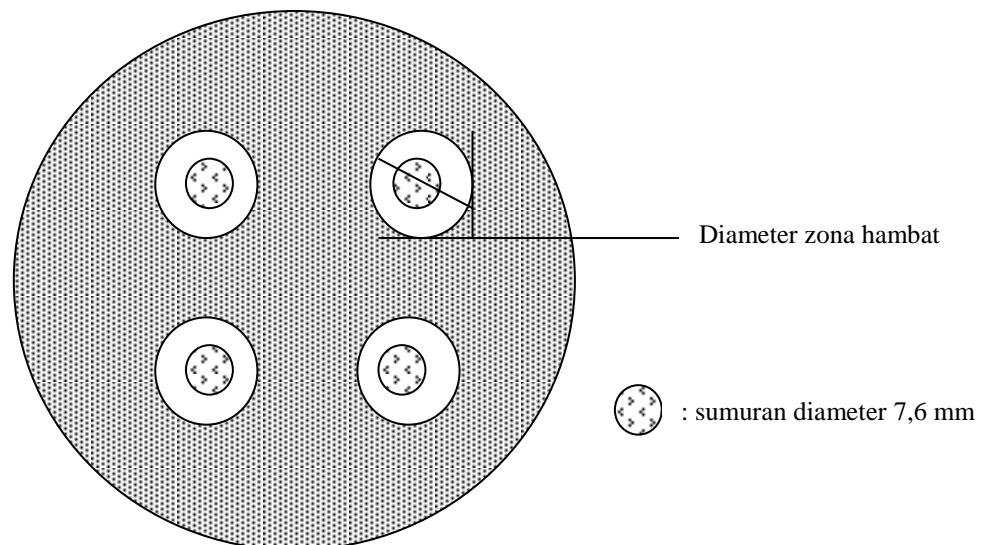
Bakteri *P. acnes* adalah bakteri mikroaerofilik sampai anaerob obligat yang tumbuh dengan baik pada kondisi kurang atau tanpa oksigen. Oleh sebab itu, bakteri yang sudah ditanam dalam media MH dalam cawan petri tidak bisa langsung dimasukkan ke dalam inkubator begitu saja. Sebelumnya, bakteri dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* terlebih dahulu. Kemudian, dimasukkan lilin yang menyala ke dalam *anaerobic jar* dan langsung tutup *anaerobic jar* dengan rapat. Tunggu sampai api lilin mati. Nyala lilin yang mati menandakan bahwa di dalam *anaerobic jar* sudah tidak terdapat oksigen. Setelah itu, media bakteri yang sudah masuk ke dalam *anaerobic jar* bisa dimasukkan ke dalam inkubator suhu 37° C dan diinkubasi selama 18–24 jam (Sutrisna, 2013).

3.9.11 Uji Kepekaan Bakteri

Peneliti menggunakan cara sumuran dalam melakukan uji kepekaan bakteri. Jadi, suspensi bakteri kira-kira 10^7 – 10^8 CFU/ml diratakan pada media agar, kemudian agar tersebut dibuat sumuran dengan tabung logam pencetak sumuran dengan garis tengah kira-kira 7,6 mm. Sebelas kelompok perlakuan yang digunakan diteteskan ke dalam masing-masing sumuran menggunakan mikropipet dengan volume 100 µl. Perlakuan 1 yaitu konsentrasi minyak atsiri 10 µl/ml, perlakuan 2 dengan konsentrasi 30 µl/ml, perlakuan 3 dengan konsentrasi 50 µl/ml, perlakuan 4 dengan konsentrasi 60 µl/ml, perlakuan 5 dengan konsentrasi 70 µl/ml, perlakuan 6 dengan konsentrasi 85 µl/ml, perlakuan 7 dengan konsentrasi 100 µl/ml, perlakuan 8 dengan konsentrasi 150 µl/ml, perlakuan 9 dengan konsentrasi 175 µl/ml *tween-80*, kontrol positif klindamisin dengan konsentrasi 20 mg dalam 1 ml akuades, dan kontrol negatif berupa *tween-80*. Selanjutnya semua perlakuan diinkubasi pada suhu 37° C selama 18–24 jam. Hasil perlakuan dibaca sama seperti cara *Kirby-Bauer*, yaitu dengan mengukur diameter lingkaran bening di sekitar sumuran dengan menggunakan jangka sorong (Wasitaningrum, 2009).

3.9.12 Pengamatan

Tahap pengamatan antibakteri ini dilakukan dengan menghitung lingkaran jernih masing-masing zona hambat yang tumbuh di sekitar sumuran. Bagian cawan petri yang diamati adalah bagian agar MH, bukan sebaliknya. Pengamatan dilakukan pada cahaya yang cukup dan alas yang gelap. Perhitungan dilakukan dengan cara mengukur diameter zona hambat pertumbuhan *P. acnes* pada media agar MH dengan menggunakan jangka sorong. Pada setiap sumuran diambil data diameter zonahambat dari tiga sisi yang berbeda, kemudian diambil rata-ratanya (Mahon *et al.*, 2011).



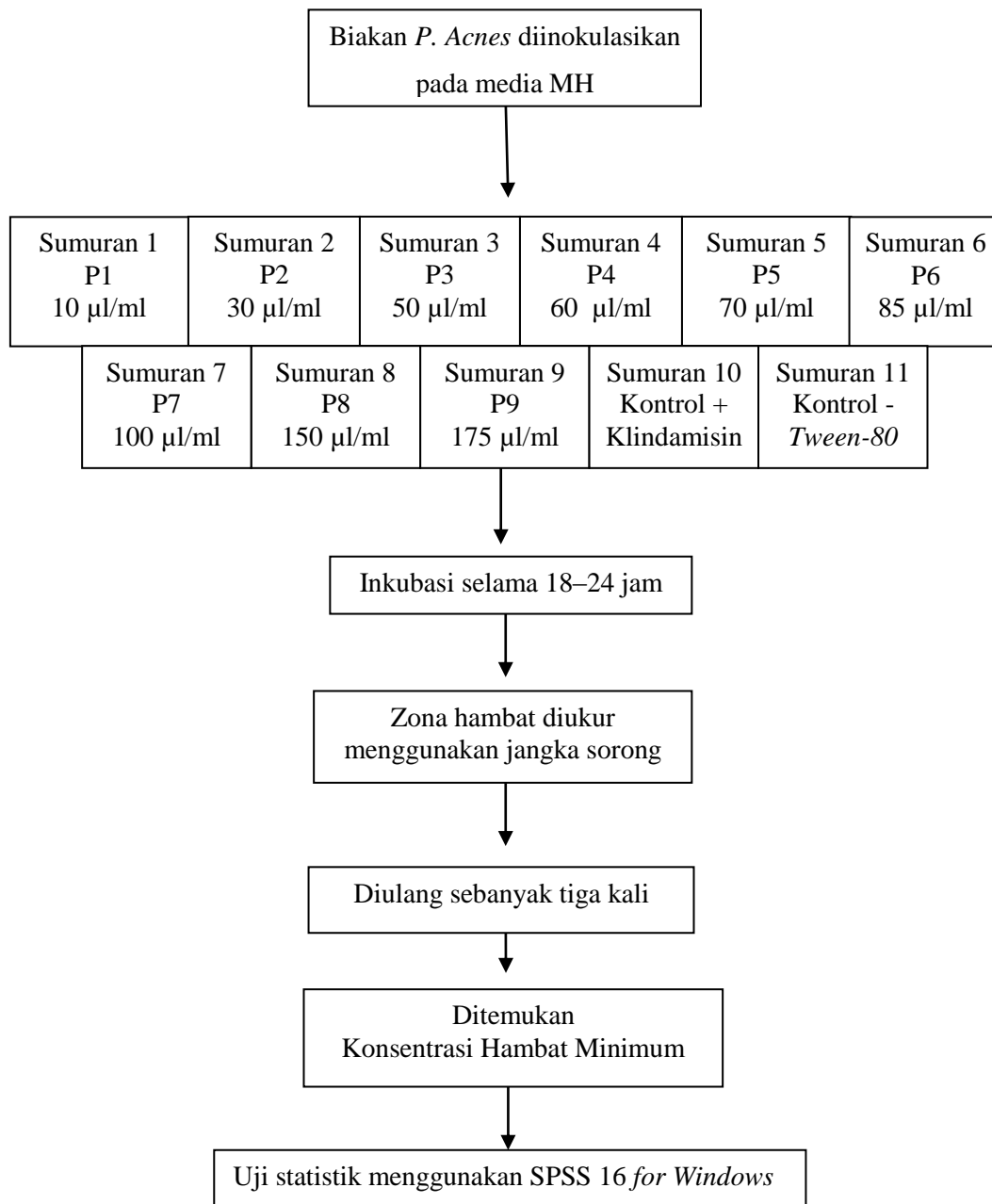
Gambar 3.4 Penghitungan zona hambat setelah diinkubasi

3.10 Analisis Data

Analisis data penelitian ini menggunakan SPSS 16 *for windows*. Pertama, dilakukan uji asumsi data berupa uji normalitas dan homogenitas pada sampel penelitian. Uji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk* untuk mengetahui distribusi data, sedangkan uji homogenitas menggunakan uji homogenitas ragam data. Jika sampel terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$), maka dilakukan uji parametrik

One Way ANOVA. Namun, karena sampel terdistribusi normal dan tidak homogen ($p < 0,05$), maka dilakukan uji nonparametrik *Kruskal Wallis* (Dahlan, 2013). Setelah itu, untuk mengetahui keamatan konsentrasi minyak atsiri terhadap diameter zona hambat, dilakukan uji korelasi *Pearson* karena data terdistribusi normal. Untuk mengetahui bentuk hubungan korelasi dan KHM secara kuantitatif, dilakukan uji regresi (Firmansyah, 2014).

3.11 Alur Penelitian



P : Perlakuan

Gambar 3.5 Skema alur penelitian