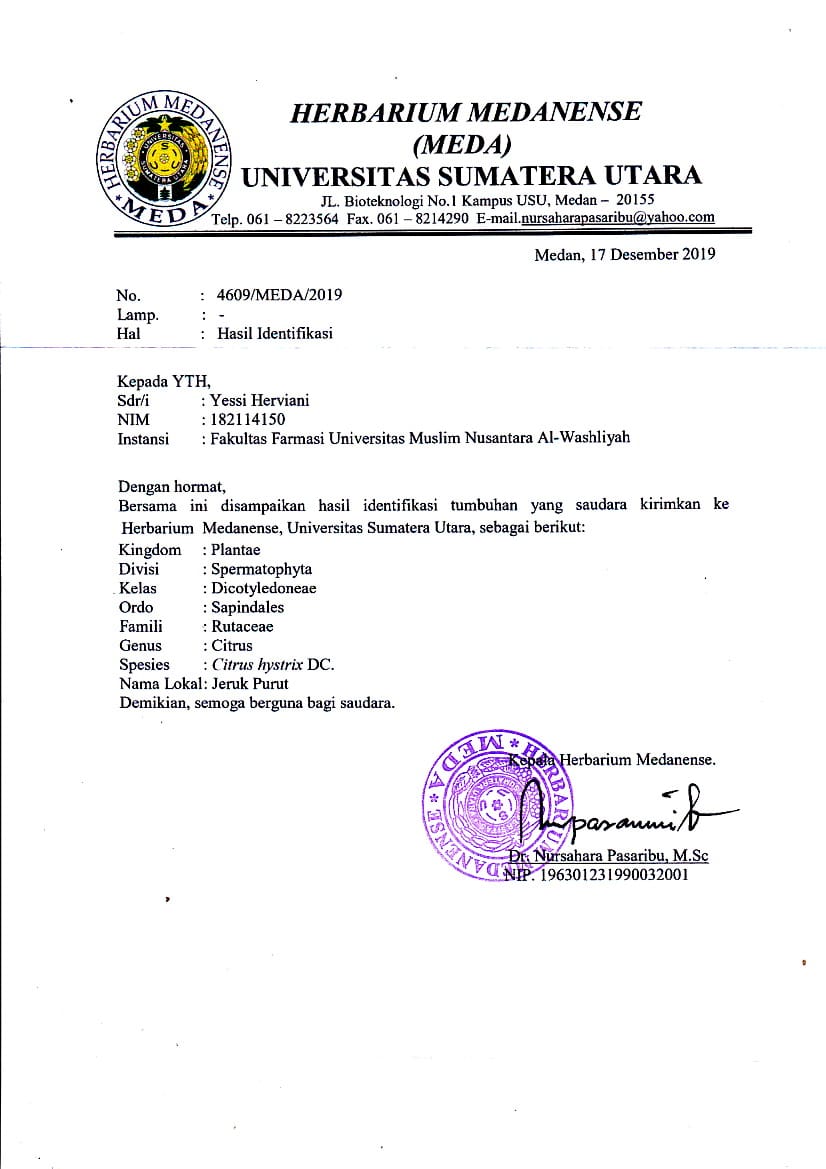
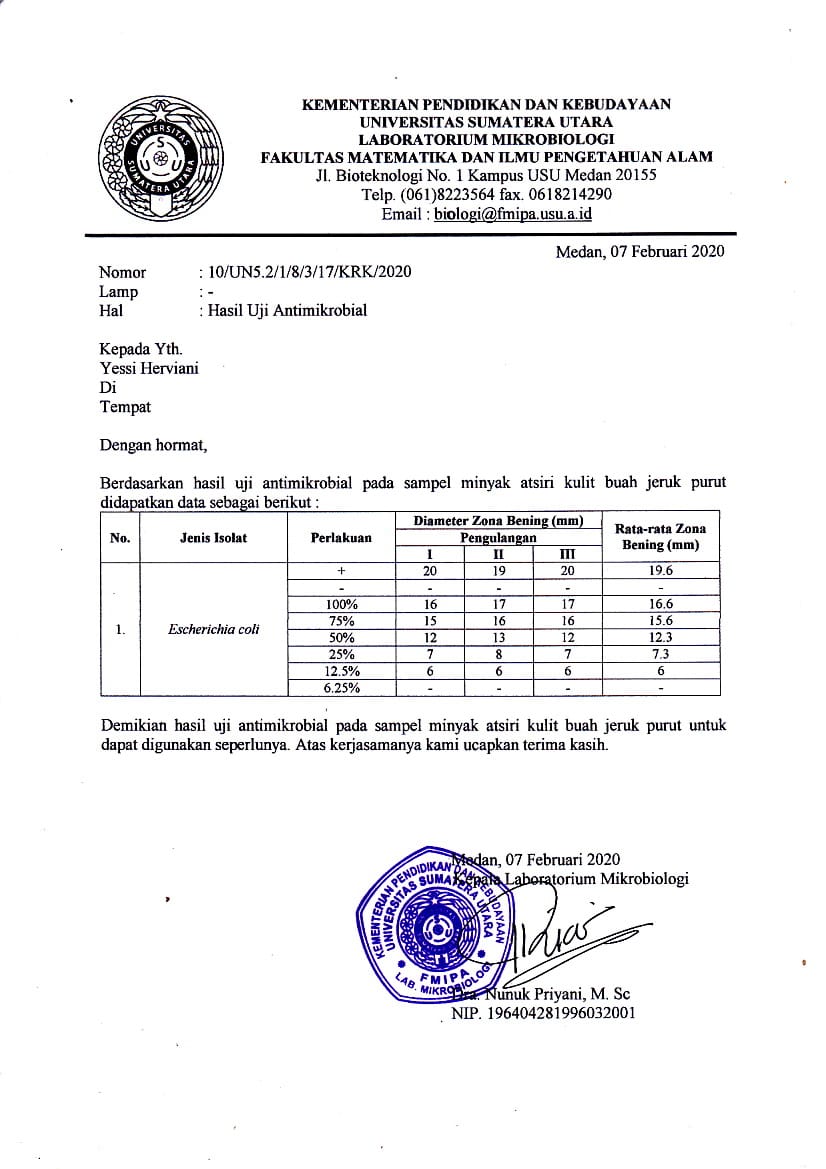
Lampiran 1. Surat keterangan uji identifikasi sampel



Lampiran 2. Surat keterangan uji daya hambat

Lampiran 3. Sampel Buah Jeruk Purut

Buah Jeruk Purut

 Kulit Buah Jeruk Purut

Lampiran 4. Bagan alir pembuatan minyak atsiri

Buah jeruk purut

Dibersihkan dari kotoran

Dicuci

Dirajang

Ditimbang

Kulit buah jeruk purut

Dimasukkan ke alat destilasi air

Dimasukkan pelarut aquadest

Dilakukan destilasi selama ± 8 jam

Minyak atsiri kulit buah jeruk purut

**Lampiran 5.** Perhitungan variasi konsentrasi minyak atsiri

Minyak atsiri kulit buah jeruk purut dibuat dalam berbagai variasi konsentrasi yaitu 100%, 75%, 50%, 25%, 12.5% dan 6.25% masing-masing sebanyak 10 ml dengan perhitungan volume minyak atsiri yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Konsentrasi 75% =x 10 mL

= 7,5 mL

1. Konsentrasi 50% =x 10 mL

= 5,0 mL

1. Konsentrasi 25% =x 10 mL

= 2,5 mL

1. Konsentrasi 12,5% =x 10 mL

= 1,25 mL

1. Konsentrasi 6,25 % = x 10 mL

= 0,6 mL

**Lampiran 6.** Bagan alir sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi alat

Semua alat dicuci bersih dan dikeringkan

Bungkus alat-alat tersebut dengan kertas perkamen dan ikat dengan benang jagung

Media pertumbuhan bakteri disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit

Alat-alat kaca disterilkan dalam oven pada suhu 180°c selama 1 jam

**Lampiran 7.** Bagan alir pembuatan media *Eosin Methylene Blue* (EMB)

EMB 37,5 g/1000 mL

Ditimbang EMB sebanyak 1,5 gram dimasukkan kedalam erlenmeyer

Ditambahkan aquadest sebanyak 40 mL

Dipanaskan sampai mendidih dan diaduk rata hingga larut

Larutan EMB

Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121˚C selama 15 menit

Ditunggu sampai dingin

Dituang cawan petri

Media EMB

**Lampiran 8.** Bagan alir pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)

NA 20 g/1000 mL

Ditimbang NA sebanyak 1,2 gram dimasukkan kedalam erlenmeyer

Ditambahkan aquadest sebanyak 60 mL

Dipanaskan sampai mendidih dan diaduk rata hingga larut

Larutan NA

Disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121˚C selama 15 menit

Ditunggu sampai dingin

Media Nutrient Agar

Sebanyak 10 mL nutrient agar dimasukkan kedalam tabung reaksi ditutup dengan kapas yang telah dilapisi kain kasa steril

Tabung reaksi yang berisi media NA diletakkan pada posisi miring dengan membentuk sudut 45º

Media Nutrient Agar Miring

**Lampiran 9.** Bagan alir pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA 34 g/1000 mL

Ditimbang Media MHA sebanyak 6,12 gram dimasukkan kedalam erlenmeyer

Ditambahkan aquadest sebanyak 180 mL

Dipanaskan sampai mendidih dan diaduk rata hingga larut

Larutan media MHA

Disterilkan dalam autoklaf padasuhu 121˚C selama 15 menit

Ditunggu sampai dingin

Dituangdalam 9 cawan petri

Media MHA

**Lampiran 10.** Bagan alir identifikasi bakteri

Bakteri uji

Diambil sedikit, diletakkan diatas objek glass

Difiksasi diatas api bunsen

Ditetesi Kristal violet, didiamkan 30 detik, dibilas dengan air mengalir

Ditetesi larutan iodium, didiamkan 30 detik dibilas dengan air mengalir, dikeringkan

Ditetesi alkohol, didiamkan 30 detik, dibilas dengan air mengalir, dikeringkan

Ditetesi safranin, didiamkan selama 30 detik, dibilas dengan air mengalir, dikeringkan

Bakteri gram negatif berbentuk batang

Preparat diamati dibawah mikroskop

Bakteri Gram Negatif bewarna merah

**Lampiran 11.**Bagan alir peremajaan bakteri

Media EMB steril

Dituangkan sebanyak 20 mL kedalam tabungreaksi

Dibiarkan pada temperature kamar sampai memadat pada posisi miring membentuk sudut 45º

Diambil biakan bakteri*Escherichia coli* dari stok kultur dengan jarum ose lalu digoreskan pada media EMB yang telah memadat

Diinkubasi pada suhu 37º selama 18-24 jam

Diamati koloni yang tumbuh

Koloni yang tumbuh berwarna hijau kilap logam

Diambil satu ose koloni yang spesifik ditanam pada media NA miring

Diinkubasi pada suhu 37º selama 18-24 jam

Bakteri uji *Escherichia coli*

**Lampiran 12.**Bagan alir pembuatan Mc Farland

Standar Mc Farland

0,5 mL larutan BaCl2 dimasukkan kedalam tabung reaksi

Ditambahkan H2SO4 sebanyak 99,5 mL

Tutup dengan kuat dan disimpan disuhu kamar

Dikocok dahulu sebelum digunakan

Standar suspensi Mc Farland

**Lampiran 13.** Bagan alir pembuatan suspensi bakteri

Koloni bakteri *Escherichia colli*

Diambil koloni bakteri *Escherichia colli* dengan menggunakan ose bulat

Disuspensikan kedalam larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 10 mL

Dihomogenkan hingga diperoleh kekeruhan Mc Farland 108 CFU/mL

Suspensi dengan kekeruhan 108 CFU/mL

Dipipet 0,1 mL dimasukkan kedalam tabung yang berisi NaCl 9,9 mL

Dihomogenkanhingga diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 106 CFU/mL

Suspensi bakteri *Escherichia coli* 106 CFU/mL

**Lampiran 14.** Bagan alir uji aktivitas antibakteri

Media *Mueller Hinton Agar* steril

Dimasukkan kedalam cawan petri steril

Didiamkan hingga memadat

Media Padat

Digoreskan suspense bakteri *Escherichia colli*

Ditempelkan cakram yang telah direndam minyak atsiri dari kulit buah jeruk purut dengan variasi konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 75%, 100%, kontrol positif dan kontrol negatif

Diinkubasi pada suhu 36-37º selama 18-24jam

Diukur diameter zona hambat yang terbentukmenggunakan jangka sorong

Hasil Diameter Zona Hambat

**Lampiran 15.** Destilasi minyak atsiri kulit buah jeruk purut

Destilasi air minyak atsiri Hasil destilat buah jerut purut



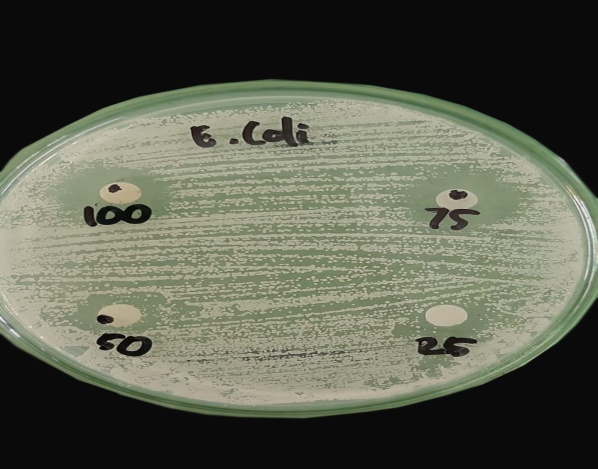
Variasi konsentrasi minyak atsiri kulit buah jeruk purut

**Lampiran 16**. Hasil pewarnaan Gram bakteri *Escherichia coli*



Hasil identifikasi bakteri *Eschherichia coli*

**Lampiran 17.** Hasil pengujian antibakteri minyak atsiri kulit buah jeruk purut terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*



E

B

A

F

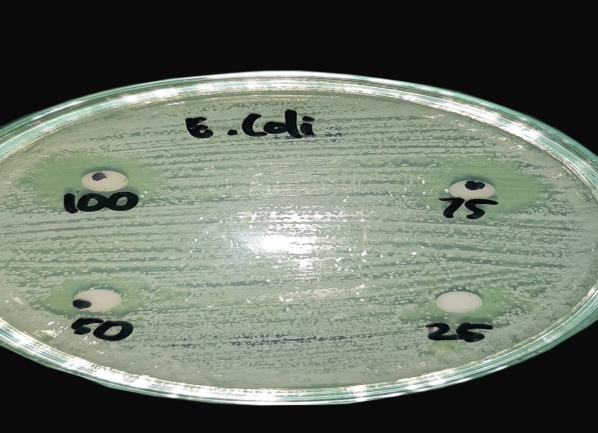
G

H

D

C

Pengulangan 1



E

F

B

A

G

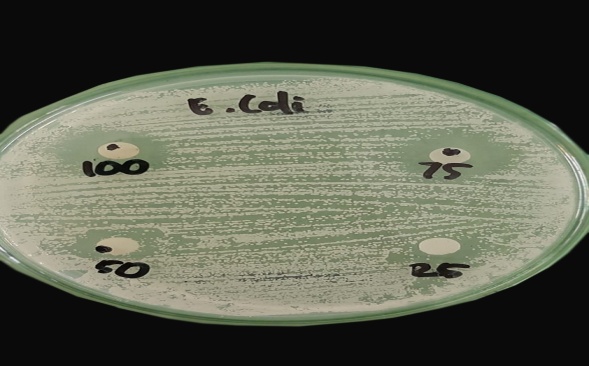
C

H

D

Pengulangan 2

**Lampiran 17.** (Lanjutan)



B

A

E

F

H

G

C

D

Pengulangan 3

Keterangan: A: Konsentrasi 100%

B: Konsentrasi 75%

C: Konsentrasi 50%

D: Konsentrasi 25%

E: Konsentrasi 12,5%

F: Konsentrasi 6,25%

G: Kontrol Negatif

H: Kontrol Positif

**Lampiran 18**. Tabel hasil zona hambat tiap pengulangan

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Bahan uji | Diameter hambat (mm) | Kategori daya hambat |
| Kontrol positif | 20 | Kuat |
| 19 | Kuat |
| 20 | Kuat |
| Rata-rata | 19,6 | Kuat |
| Standar Deviasi | 0,57 |  |
| Diameter ± Standar Deviasi | 19,6 ± 0,57 |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Bahan uji | Diameter hambat (mm) | Kategori daya hambat |
| Kontrol negatif | 0 | Tidak Ada |
| 0 | Tidak Ada |
| 0 | Tidak Ada |
| Rata-rata | 0 | Tidak Ada |
| Standar Deviasi | 0 |  |
| Diameter ± Standar Deviasi | 0 ± 0 |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Bahan uji | Diameter hambat (mm) | Kategori daya hambat |
| MAKJP Konsentrasi 6,25% | 0 | Tidak Ada |
| 0 | Tidak Ada |
| 0 | Tidak Ada |
| Rata-rata | 0 | Tidak Ada |
| Standar Deviasi | 0 |  |
| Diameter ± Standar Deviasi | 0 ± 0 |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Bahan uji | Diameter hambatan (mm) | Kategori daya hambat |
| MAKJP Konsentrasi 12,5% | 6 | Lemah |
| 6 | Lemah |
| 6 | Lemah |
| Rata-rata | 6 | Lemah |
| Standar Deviasi | 0 |  |
| Diameter ± Standar Deviasi | 6 ± 0 |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Bahan uji | Diameter hambat (mm) | Kategori daya hambat |
| MAKJP Konsentrasi 25% | 7 | Lemah |
| 8 | Lemah |
| 7 | Lemah |
| Rata-rata | 7,3 | Lemah |
| Standar Deviasi | 0,57 |  |
| Diameter ± Standar Deviasi | 7,3 ± 0,57 |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Bahan uji | Diameter hambat (mm) | Kategori daya hambat |
| MAKJP Konsentrasi 50% | 12 | Lemah |
| 13 | Lemah |
| 12 | Lemah |
| Rata-rata | 12,3 | Lemah |
| Standar Deviasi | 0,57 |  |
| Diameter ± Standar Deviasi | 12,3 ± 0,57 |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Bahan uji | Diameter hambat (mm) | Kategori daya hambat |
| MAKJP Konsentrasi 75% | 15 | Kuat |
| 16 | Kuat |
| 16 | Kuat |
| Rata-rata | 15,6 | Kuat |
| Standar Deviasi | 0,57 |  |
| Diameter ± Standar Deviasi | 15,6 ± 0,57 |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Bahan uji | Diameter hambat (mm) | Kategori daya hambat |
| MAKJP Konsentrasi 100% | 16 | Kuat |
| 17 | Kuat |
| 17 | Kuat |
| Rata-rata | 16,6 | Kuat |
| Standar Deviasi | 0,57 |  |
| Diameter ± Standar Deviasi | 16,6 ± 0,57 |  |

Keterangan:

MAKJP : Minyak atsiri kulit buah jeruk purut