

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirsak yang diperoleh di daerah Boyolali, Jawa Tengah dan daun alpukat yang diperoleh di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

1. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak dan daun alpukat. Daun sirsak dan daun alpukat yang diambil adalah bagian daun berwarna hijau dipilih yang segar, tidak layu, bebas penyakit dan diambil secara acak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% kombinasi daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill.)

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 70% kombinasi daun sirsak dan daun alpukat terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini kombinasi ekstrak etanol 70% dengan perbandingan 1:1; 1:2 dan 2:1 dari daun sirsak dan daun alpukat terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini kombinasi ekstrak etanol 70% dari daun sirsak dan daun alpukat dengan perbandingan (1:1); (1:2) dan (2:1).

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 35668, sterilisasi, suhu, kondisi peneliti, kondisi laboratorium, media dan metode penelitian.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol 70% daun sirsak dan daun alpukat yang dapat mempengaruhi pertumbuhan *Streptococcus mutans* ATCC 35668 pada media uji.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sirsak yang diambil secara acak di daerah Boyolali, Jawa Tengah, dengan ciri-ciri tidak layu, segar, berwarna hijau dan bebas penyakit.

Kedua, daun alpukat yang diambil secara acak di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, dengan ciri-ciri tidak layu, segar, berwarna hijau dan bebas penyakit.

Ketiga, serbuk daun sirsak dan daun alpukat yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir untuk membersihkan kotoran yang masih menempel, dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C, kemudian dibuat serbuk menggunakan alat penggiling dan diayak dengan pengayak nomor 40.

Keempat, ekstrak etanol daun sirsak dan ekstrak daun alpukat adalah hasil ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Kelima, kombinasi ekstrak etanol 70% daun sirsak dengan daun alpukat (1:1) adalah ekstrak etanol daun sirsak 500 mg dan ekstrak etanol daun alpukat 500 mg dicampurkan dan diencerkan dengan tween 80 5%.

Keenam, kombinasi ekstrak etanol 70% daun sirsak dengan daun alpukat (1:2) adalah ekstrak etanol daun sirsak 500 mg dan ekstrak etanol daun alpukat 1.000 mg dicampurkan dan diencerkan dengan tween 80 5%.

Ketujuh, kombinasi ekstrak etanol 70% daun sirsak dengan daun alpukat (2:1) adalah ekstrak etanol daun sirsak 1.000 mg dan ekstrak etanol daun alpukat 500 mg dicampurkan dan diencerkan dengan tween 80 5%.

Kedelapan, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Streptococcus mutans* ATCC 35668 dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kesembilan, kontrol positif dalam penelitian ini adalah antibiotik siprofloksasin dan kontrol negatif adalah tween 80 5% dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kesepuluh, dalam penelitian ini metode difusi digunakan untuk uji aktivitas antibakteri ekstrak terefektif. Metode difusi dilakukan cara sumuran dengan mengukur luas daerah hambatan atau daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri. Diujikan pada ekstrak tunggal etanol 70% daun sirsak, ekstrak tunggal etanol 70% daun alpukat, serta kombinasi ekstrak etanol 70% daun sirsak dan daun alpukat dengan perbandingan (1:1); (1:2); dan (2:1) terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

Kesebelas, untuk mendeteksi bercak senyawa pada kromatogram hasil KLT ekstrak tunggal etanol 70% daun sirsak, ekstrak tunggal etanol 70% daun alpukat, serta kombinasi ekstrak etanol 70% daun sirsak dan daun alpukat dengan perbandingan (1:1); (1:2); dan (2:1) yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat timbang, penggilingan, wadah plastik, labu erlenmayer, botol coklat, kain flanel, kertas

saring, corong pisah, gelas ukur, inkas, jarum ose, pinset, batang pengaduk, cawan porselin, lampu spiritus, kaki tiga, kassa, ayakan no. 40, oven, rotary evaporator, autoklaf, inkubator, mikropipet, autovortex mixer, mikroskop, pipet volume steril, deck glass, objek glass, botol vial steril, inkas, neraca analitik dan penggaris, plat KLT, detektor sinar UV 254 nm dan 366 nm.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sebagai berikut daun sirsak dan daun alpukat, bakteri *Streptococcus mutans*, Siprofloksasin, etanol 70%, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media *Brain Heart Infusion* (BHI), FeCl₃, *Dragendroff*, tween 80 5%, silika gel, H₂SO₄, CH₃COOH, serbuk Mg, dan HCl.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap awal dalam penelitian ini adalah melakukan identifikasi tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) dan tanaman alpukat (*Persea americana* Mill.) yang bertujuan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan, serta menghindari kemungkinan tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Menetapkan kebenaran sampel daun sirsak dan daun alpukat berdasarkan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis, serta mencocokkan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman sirsak dan tanaman alpukat terhadap kepustakaan yang dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Daun sirsak diperoleh di Boyolali dan daun alpukat diperoleh di Tawangmangu, Karanganyar. Daun sirsak dan daun alpukat yang diambil yang masih segar, berwarna hijau, bebas dari penyakit, dan bersih selanjutnya dibersihkan dari kotoran dan tanah yang masih menempel. Bahan yang digunakan dirajang terlebih dahulu selanjutnya dianginkan untuk menjaga keawetan dan mencegah timbulnya jamur.

3. Pembuatan serbuk

Serbuk daun sirsak dan daun alpukat dibuat dengan cara dicuci bersih terlebih dahulu di bawah air mengalir, kemudian ditiriskan untuk membebaskan dari sisa air cucian, selanjutnya dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C kurang lebih 3-4 hari, setelah kering kemudian diserbuk dengan mesin penyerbuk atau blender lalu diayak menggunakan ayakan nomor 40 untuk mendapatkan serbuk dengan derajat kehalusan yang relatif homogen. Kemudian dilakukan persentase perhitungan.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk

Dilakukan penetapan susut pengeringan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Diatur temperatur pada suhu 110°C dengan waktu pengeringan secara manual 15 menit kemudian dimasukkan pada neraca timbang dengan skala 0,00 maka sampel serbuk daun sirsak dan daun alpukat sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam masing-masing tempat. Ditunggu sampai alat *Moisture Balance* sampai berbunyi yang akan menunjukkan hasil dalam satuan persen (%). Konsentrasi kadar lembab akan memenuhi syarat apabila konsentrasi air suatu serbuk simplisia tidak lebih dari 10%.

5. Penetapan kadar air ekstrak

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen. Toluena yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu, setelah itu dikocok dan didiamkan, kedua lapisan air dan toluene akan memisah kemudian air dibuang. Sebanyak 10 gram serbuk ditimbang dengan seksama, kemudian dimasukkan pada alas bulat dimasukkan 200 ml toluene pada labu. Labu dipanaskan secara hati-hati selama 15 menit, setelah toluen mendidih atur penyulingan dengan kecepatan penyulingan kurang lebih 2 tetes/detik, hingga sebagian besar air tersaring. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit, kemudian didinginkan tabung pada suhu ruang. Volume air dibaca setelah air dan toluene memisah secara sempurna.

6. Pembuatan ekstrak etanol 70%

6.1. Ekstrak etanol daun sirsak. Serbuk daun sirsak dilakukan maserasi dengan perbandingan 1 bagian simplisia dimasukkan dalam 10 bagian cairan penyari (1:10). Serbuk daun sirsak ditimbang sebanyak 500 gram ditambahkan etanol 70% sebanyak 5 liter. Kemudian maserasi dilakukan dengan cara didiamkan selama 5 hari sambil sesekali digojog dalam keadaan tertutup, dengan menggunakan wadah gelap dan terhindar dari cahaya. Hasil maserat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, sampai didapatkan ekstrak yang pekat. Kemudian dilakukan penetapan persen randemen, diperoleh dengan cara menimbang hasil ekstrak kental, kemudian hasil ekstrak dibagi dengan berat serbuk, kemudian dikalikan 100% (Depkes RI 2013)

6.2. Ekstrak etanol daun alpukat. Serbuk daun alpukat dilakukan maserasi dengan perbandingan 1 bagian simplisia dimasukkan dalam 10 bagian cairan penyari (1:10). Serbuk daun alpukat ditimbang sebanyak 500 gram ditambahkan etanol 70% sebanyak 5 liter. Kemudian maserasi dilakukan dengan cara didiamkan selama 5 hari sambil sesekali digojog dalam keadaan tertutup, dengan menggunakan wadah gelap dan terhindar dari cahaya. Hasil maserat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, sampai didapatkan ekstrak yang kental. Kemudian dilakukan penetapan persen randemen, diperoleh dengan cara menimbang hasil ekstrak pekat, kemudian hasil ekstrak dibagi dengan berat serbuk, kemudian dikalikan 100% (Depkes RI 2013).

7. Tes bebas etanol

Tes bebas etanol ekstrak daun sirsak dan ekstrak daun alpukat dengan mengesterifikasi alkohol. Esterifikasi dengan menggunakan reagen H₂SO₄ pekat dan CH₃COOH, kemudian dipanaskan. Bila tidak tercium bau ester (etil asetat) menandakan ekstrak daun sirsak dan ekstrak daun alpukat tidak terdapat etanol (Zhang *et al.* 2004).

8. Identifikasi kandungan kimia

8.1. Identifikasi flavonoid. 0,5 gram serbuk dan ekstrak dilarutkan masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan serbuk Mg, 0,2 ml HCl

pekat dan beberapa tetes amil alkohol. Larutan dikocok dan dibiarkan memisah. Reaksi positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah/jingga/kuning pada amil alkohol (Yunita *et al.* 2009).

8.2. Identifikasi alkaloid. 0,5 gram serbuk dan ekstrak kemudian ditambah dengan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat diuji dengan pereaksi reagent *Mayer*, *Wagner*, dan *Dragendroff*. Hasil positif *Mayer* ditandai dengan endapan putih. Hasil positif *Dragendroff* ditandai dengan endapan merah jingga dan hasil positif *Wagner* ditandai dengan endapan coklat. Apabila terjadi endapan paling sedikit dua dari tiga percobaan di atas, maka positif mengandung senyawa alkaloid, akan tetapi apabila endapan tersebut tidak muncul, maka sampel menunjukkan hasil negatif untuk senyawa alkaloid (Depkes 1995).

8.3. Identifikasi tanin. 0,5 gram serbuk dan ekstrak masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 20 ml air, kemudian larutannya disaring dan filtrat ditambah 3 tetes FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman (Yunita *et al.* 2009).

8.4. Identifikasi saponin. ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisikan aquadest 10 ml, kemudian dikocok dan ditambahkan satu tetes larutan asam klorida 2 N dan didiamkan. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil dengan ketinggian 1-3 cm selama 30 detik (Novitasari dan Putri 2016).

9. Pembuatan ekstrak kombinasi

Ekstrak etanol 70% daun sirsak dan ekstrak etanol 70% daun alpukat dikombinasi dengan perbandingan (1:1); (1:2) dan (2:1). Perbandingan (1:1) dibuat dengan mengambil ekstrak daun sirsak sebanyak 500 mg dan ekstrak daun alpukat 500 mg. Perbandingan (1:2) dibuat dengan mengambil ekstrak daun sirsak sebanyak 500 mg dan ekstrak etanol 70% daun alpukat 1.000 mg. Perbandingan (2:1) dibuat dengan mengambil ekstrak daun sirsak sebanyak 1.000 mg dan ekstrak daun alpukat 500 mg. Masing-masing kombinasi ekstrak dibuat dalam konsentrasi yang sama yaitu 50% ekstrak dilarutkan dalam tween 80 5%.

Pemilihan tween 80 5% sebagai kontrol negatif karena, tween merupakan surfaktan golongan nonionik yang bersifat tidak toksik dan mampu melarutkan semua senyawa yang bersifat polar, semipolar dan nonpolar. Selain itu, tidak memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri berkisar antara 2-8% (Sugijanto 2009).

10. Sterilisasi

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit, 2 atm. Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan oven pada suhu 170-180⁰C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung (Suriawiria 2005).

11. Pembuatan suspensi bakteri uji *Streptococcus mutans*

Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dengan cara mengambil 2 atau 3 ose bakteri dari biakan, kemudian dicampur dalam 2 ml media BHI (*Brain Heart Infusion*) steril. Setelah itu tabung reaksi ditutup dengan kapas dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Lalu dibandingkan dengan 0,5 Mc Farland yang dianggap setara dengan 1,5x10⁸ CFU/mL bakteri *Streptococcus mutans* (Janata *et al.* 2014).

12. Identifikasi bakteri *Streptococcus mutans*

12.1. Identifikasi bakteri dengan cawan gores. *Streptococcus mutans* ATCC 35668 ditumbuhkan pada media *Blood Agar Plate* (BAP) pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam, kemudian diamati hasil positif akan tampak koloni berbentuk bulat, koloni yang berwarna hijau transparan (α -hemolisis).

12.2. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan bakteri Gram Positif *Streptococcus mutans* dilakukan dengan cara pengecatan Gram. Pertama dibuat apusan diatas objek glass, kemudian difiksasi. Selanjutnya ditetesi pewarna Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama) selama 1 menit, lalu dicuci lanjutkan ditetesi dengan Gram B (lugol iodine sebagai mordan) selama 1 menit. Cuci kembali dan lanjutkan ditetesi dengan pewarna Gram C (etanol:aseton

= 1:1 sebagai peluntur) selama 30 detik. Terakhir ditetesi dengan pewarna Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup) selama 1 menit kemudian dicuci dan dikeringanginkan, setelah kering amati dengan mikroskop. Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 35668 dinyatakan positif apabila berwarna ungu, dan berbentuk coccus berderet.

12.3. Identifikasi biokimia. Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase dengan cara mengoleskan biakan bakteri murni *Streptococcus mutans* pada obyek glass selanjutnya ditetesi 2 tetes hidrogen peroksida 3 % (H_2O_2). Penambahan H_2O_2 3 % akan terurai menjadi H_2O dan O_2 , hal ini ditandai dengan timbulnya gelembung udara. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara dan hasil negatif ditandai dengan tidak terbentuk gelembung udara. Pada bakteri *Streptococcus mutans*, hasil dinyatakan negatif karena, tidak terdapat enzim katalase pada bakteri uji dengan dinyatakan tidak terbentuk gelembung udara (Jawetz *et al.* 2013).

Uji koagulase bisa dilakukan dengan 2 metode, yaitu uji *slide* dan uji tabung. Uji *slide* dikerjakan dengan cara setetes aquadest atau NaCl steril diletakkan pada obyek glass, ditambahkan sebanyak satu ose bakteri uji pada obyek glass setelah itu teteskan plasma sitrat. Keduanya dicampur dengan menggunakan ose. Reaksi positif terjadi apabila dalam waktu 2-3 menit terbentuk gumpalan jika reaksi negatif tidak terbentuk gumpalan. Pada bakteri *Streptococcus mutans*, hasil dinyatakan positif ditandai dengan terbentuknya gumpalan (Bruckler *et al* 1994).

Uji tabung digunakan adanya koagulase bebas dengan cara 200 μ l plasma sitrat dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril. Sebanyak 3-4 koloni biakan *Streptococcus mutans* yang diuji ditambahkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampur hati-hati. Selanjutnya, tabung dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan pada 4 jam pertama, dan sesudah 18-24 jam. Reaksi positif pada bakteri *Streptococcus mutans* akan terjadi apabila terbentuk *cloth* atau *jelly* dan ketika tabung dimiringkan *jelly* tetap berada didasar tabung atau bisa juga ditandai dengan terbentuknya gumpalan (Lay 1994).

13. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri adalah metode difusi. Metode difusi digunakan untuk mengetahui adanya daya hambat terhadap bakteri uji dan untuk menentukan diameter daerah hambat dari kombinasi ekstrak daun sirsak dan ekstrak daun alpukat yang dibuat dengan berbagai perbandingan yaitu (1:1), (1:2), dan (2:1). Penelitian ini menggunakan cawan petri yang berisi MHA (*Mueller Hinton Agar*). Pertama suspensi bakteri diambil dari media BHI dengan menggunakan kapas lidi steril sebanyak satu kali kemudian dioleskan pada cawan petri yang berisi MHA (*Mueller Hinton Agar*) tersebut dan didiamkan selama 5 menit dalam keadaan steril. Kemudian dibuat lubang sumuran pada media MHA dengan *Boor Prop* dan dimasukkan larutan ekstrak tunggal daun sirsak, larutan ekstrak tunggal daun alpukat, larutan kombinasi ekstrak daun sirsak dan ekstrak daun alpukat. Kombinasi yang pertama berisi kombinasi 1:1, yang kedua berisi kombinasi 1:2, yang ketiga berisi kombinasi 2:1. Kontrol positif menggunakan antibiotik Siprofloksasin dan kontrol negatif tween 80 5% kedalam lubang sumuran sebanyak 50 µl diberi label pada masing-masing lubang. Kemudian dilakukan pengulangan tiga sekali. Setelah itu cawan petri diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37⁰C. Inkubasi dilakukan selama 24 jam, setelah itu diukur zona hambat yang terbentuk.

14. Bioautografi

Uji bioautografi dilakukan untuk mendeteksi adanya senyawa aktif yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri dari kombinasi ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat. Dalam penelitian ini menggunakan bioautografi kontak. Ekstrak daun sirsak dan daun alpukat ditotolkan sebanyak 2µl pada plat KLT, setelah itu dielusi dengan menggunakan fase gerak dalam penelitian ini digunakan 3 eluen yang berbeda yaitu butanol-asam asetat-air (4:1:5), metanol-air (6:4) dan kloroform-metanol-air (60:30:10), lalu diangin-anginkan. Plat KLT diletakkan selama 30 menit supaya senyawa dalam ekstrak berdifusi pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dalam cawan petri yang telah diinokulasi bakteri *Streptococcus mutans*. Plat KLT diangkat dari media dengan hati-hati, kemudian

media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan mengamati letak bercak yang menunjukkan aktivitas antibakteri yaitu bercak jernih. Bercak tersebut diukur harga hRf-nya (Kusumaningtyas *et al.* 2008).

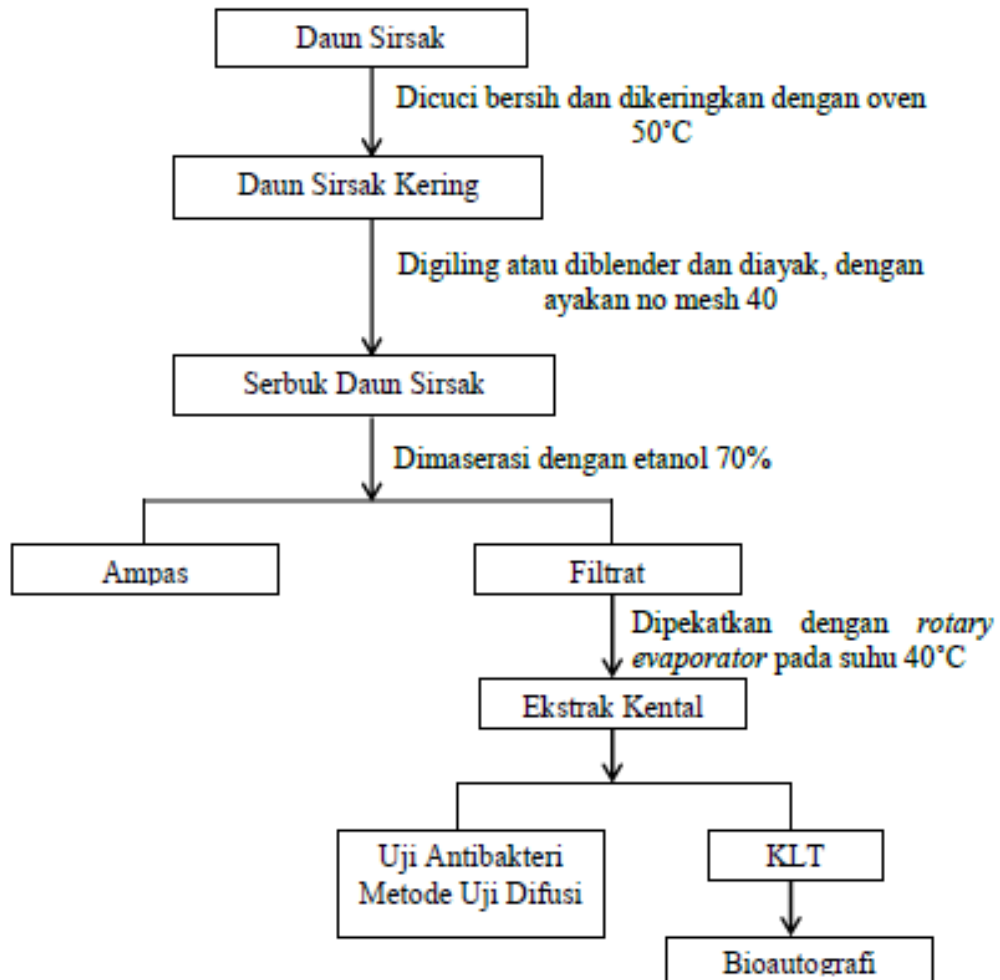
Rumus hitung hRf bercak:

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh noda}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

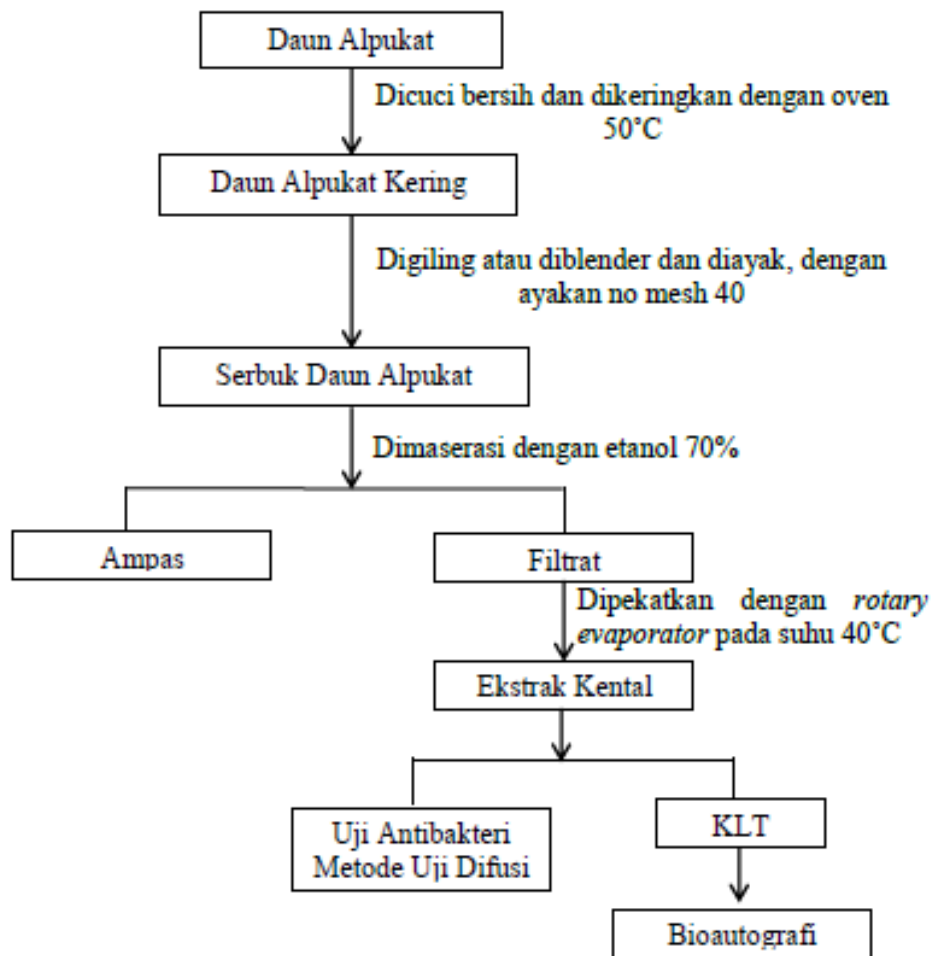
E. Analisis Hasil

Data hasil penelitian diperoleh dengan dengan membandingkan hasil daerah hambatan dari ekstrak tunggal daun sirsak, ekstrak tunggal daun alpukat, kombinasi ekstrak daun sirsak dan daun alpukat dengan perbandingan (1:1), (1:2), dan (2:1) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *Kolmogorof-Sminov*, jika terdistribusi secara normal ($p > 0,05$) kemudian dilanjutkan dengan *analysis of varian* (ANOVA) satu jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Lanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka dilanjutkan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk untuk mengetahui perbandingan kombinasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda satu dengan yang lainnya.

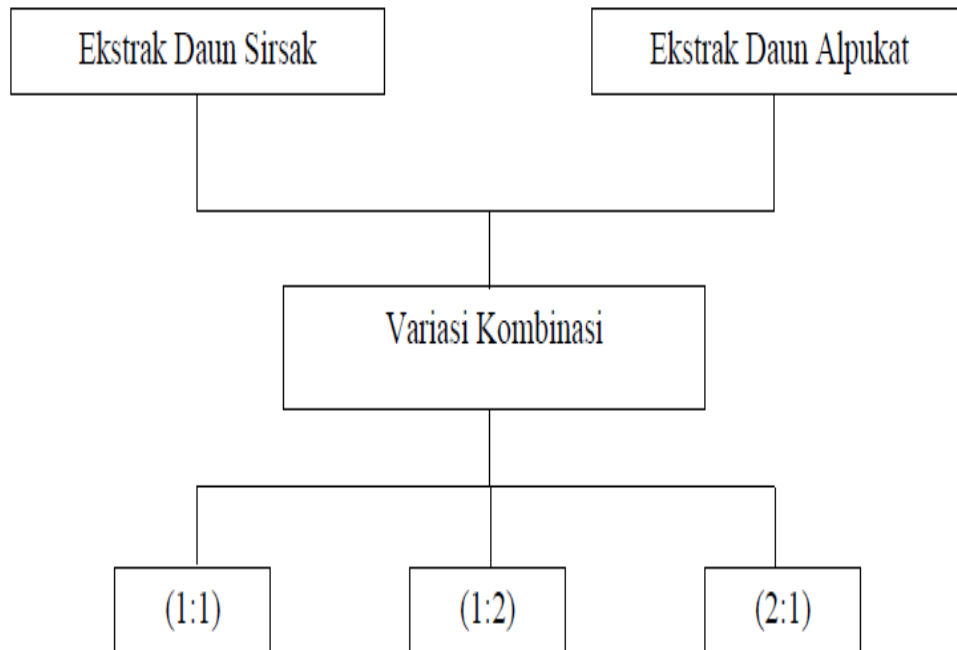
F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak etanol 70 % daun sirsak



Gambar 6. Skema pembuatan ekstrak etanol 70 % daun alpukat



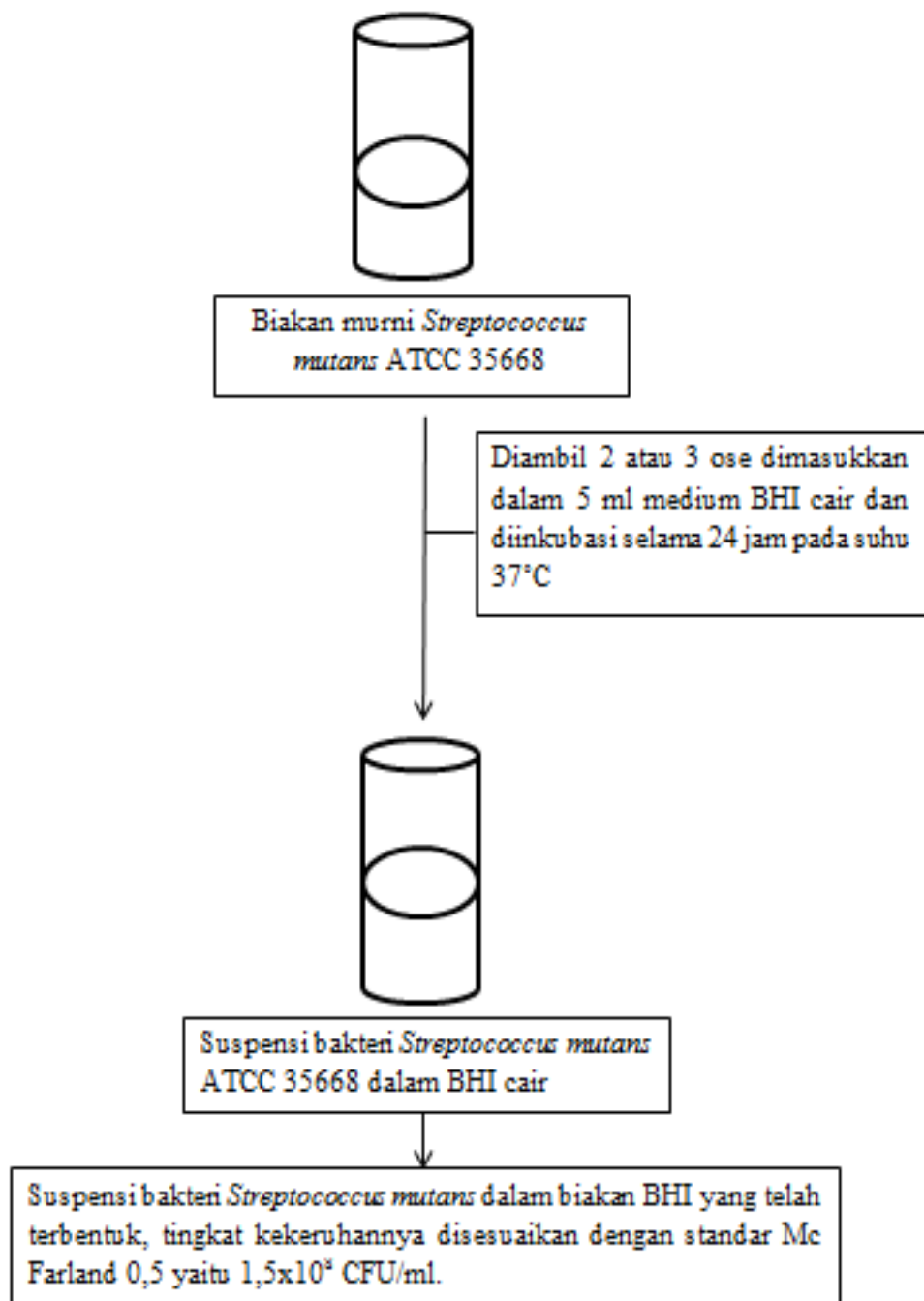
Keterangan :

(1:1) = 500 mg ekstrak daun sirsak + 500 mg ekstrak daun alpukat dengan konsentrasi 50%.

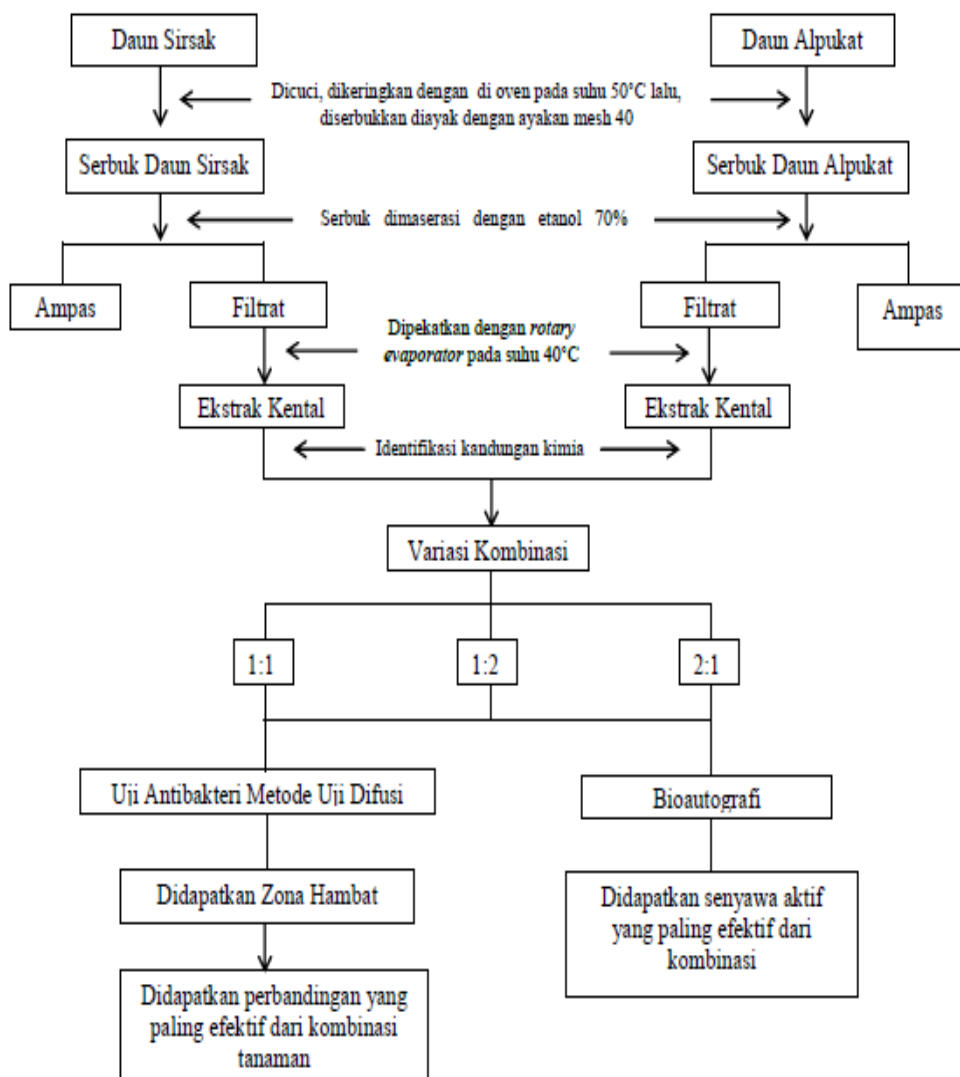
(1:2) = 500 mg ekstrak daun sirsak + 1500 mg ekstrak daun alpukat dengan konsentrasi 50%.

(2:1) = 1500 mg ekstrak daun sirsak + 500 mg ekstrak daun alpukat dengan konsentrasi 50%.

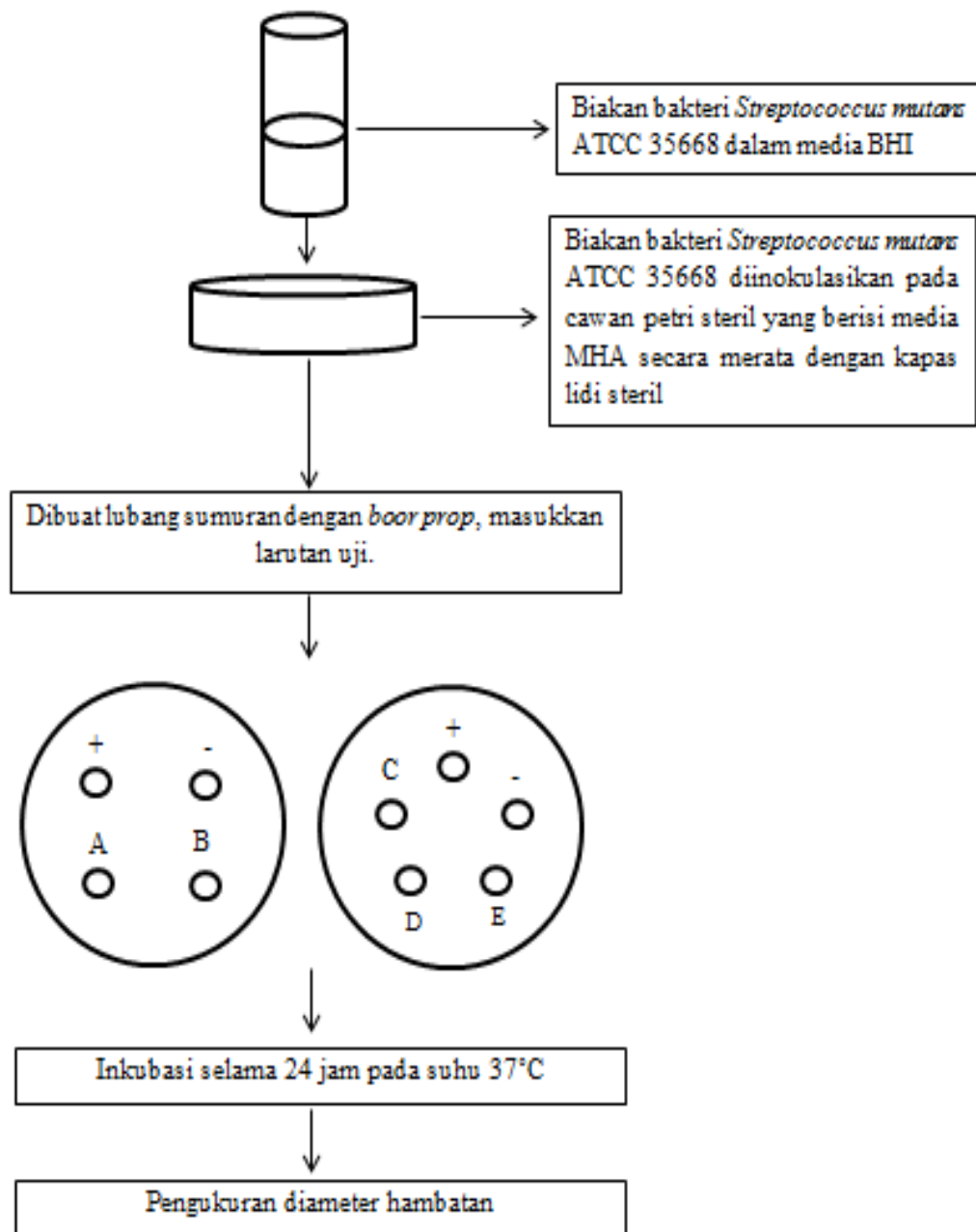
Gambar 7. Skema pembuatan kombinasi ekstrak daun sirsak dan ekstrak daun alpukat



Gambar 8. Skema pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 35668



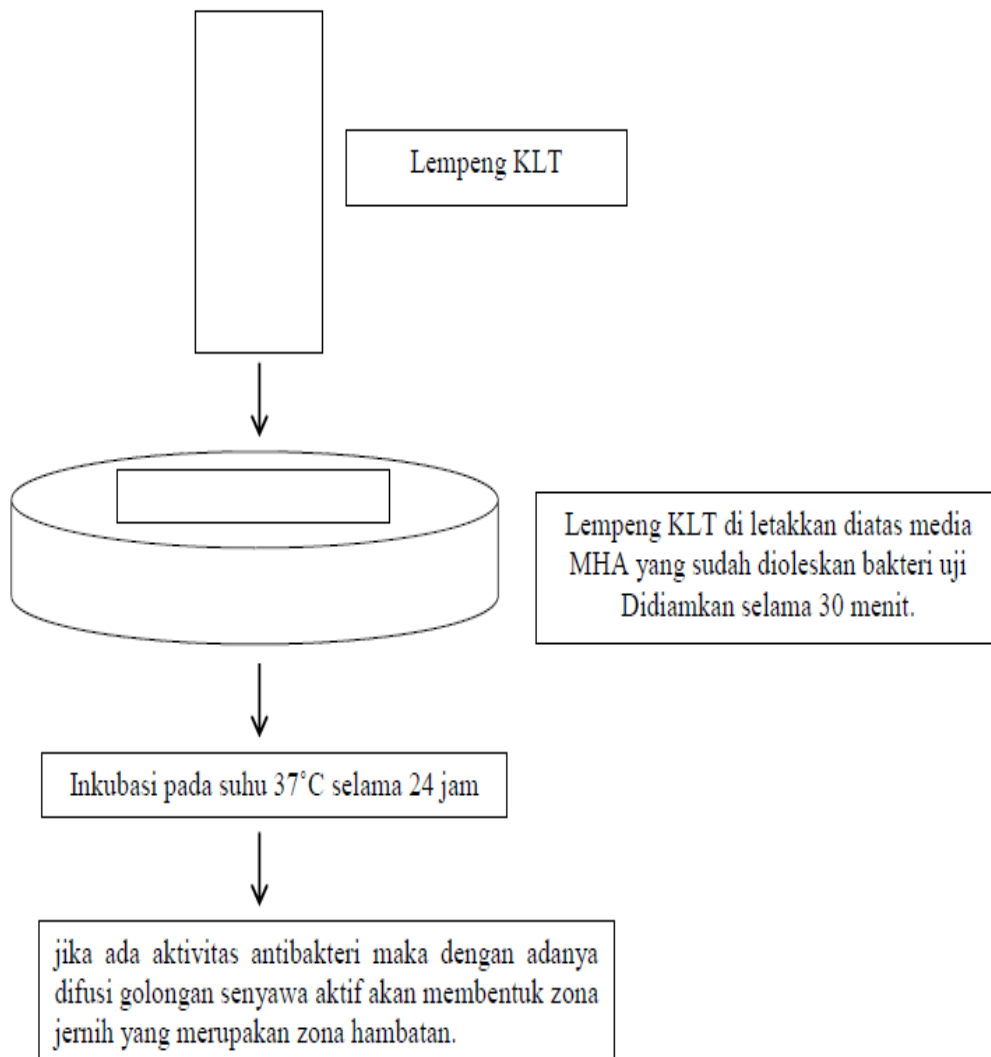
Gambar 9. Skema diagram kerja pengujian aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol 70% daun sirsak dan daun alpukat terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 35668



Keterangan:

(+) Kontrol positif siprofloksasin, (-) Kontrol negatif tween 80 5%, (A) Ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 50%, (B) Ekstrak daun alpukat dengan konsentrasi 50%, (C) Kombinasi ekstrak daun sirsak dan ekstrak daun alpukat (1:1) dengan konsentrasi 50%, (D) Kombinasi ekstrak daun sirsak dan ekstrak daun alpukat (1:2) dengan konsentrasi 50%, (E) Kombinasi ekstrak daun sirsak dan ekstrak daun alpukat (2:1) dengan konsentrasi 50%.

Gambar 10. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 35668



Gambar 11. Skema uji antibakteri dengan metode bioautografi

