

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah seluruh objek dengan ciri atau sifat tertentu untuk peneliti mengidentifikasi dan menarik kesimpulan (Darwin *et al*, 2021). Pada penelitian, populasi yang digunakan adalah kulit nanas yang diperoleh dari daerah Blitar, Jawa Timur, dan daun alpukat yang didapatkan dari daerah Sukoharjo, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian dari populasi yang diambil sampelnya menurut cara teknis sejumlah sampel untuk mewakili karakteristik populasi (Darwin *et al*, 2021). Sampel yang digunakan pada penelitian adalah kulit nanas yang diambil dengan kondisi masih segar, tidak rusak, dan tidak terkena penyakit, serta daun alpukat yang diambil dengan kondisi daun tidak terlalu tua, daun berwarna hijau, segar, dan tidak terkena penyakit.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dari penelitian adalah ekstrak etanol kulit buah nanas dan daun alpukat.

Variabel utama kedua dari penelitian adalah nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol kulit buah nanas dan daun alpukat terhadap *S. aureus*.

Variabel utama ketiga dari penelitian adalah efek kombinasi ekstrak etanol kulit buah nanas dan daun alpukat dengan perbandingan (1:1); (1:2); (2:1) terhadap *S. aureus*.

Variabel utama keempat dari penelitian adalah pola kombinasi ekstrak etanol kulit buah nanas dan daun alpukat terhadap *S. aureus*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian dibagi menjadi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja direncanakan atau diubah oleh peneliti untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian adalah konsentrasi dan kombinasi ekstrak kulit buah nanas dan daun alpukat.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan kriteria penilaian. Variabel tergantung pada penelitian adalah aktivitas kombinasi dari ekstrak kulit buah nanas dan daun alpukat yang dapat mempengaruhi Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan pola kombinasi dari bakteri *S. aureus*.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya. Variabel terkontrol pada penelitian adalah jumlah koloni *S. aureus*, suhu, kondisi laboratorium, sterilisasi, metode penelitian, waktu inkubasi bakteri dan media pertumbuhan bakteri.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, kulit nanas adalah kulit yang diambil dengan ciri-ciri kulit masih segar, tidak rusak, dan terbebas dari penyakit. Kulit nanas dikupas menggunakan pisau dengan cara iris bagian mahkota nanas sepanjang 1 cm di bawah daun, kemudian iris bagian bawah nanas. Iris bagian samping nanas dari atas ke bawah untuk mendapatkan kulitnya, agar tidak banyak membuang daging nanas, iris kulit nanas setebal kira-kira 0,5 cm.

Kedua, daun alpukat adalah daun yang diambil dengan ciri-ciri daun berwarna hijau tua, yang sudah maksimal proses fotosintesis, dan diambil mulai dari daun kedua setelah pucuk.

Ketiga, serbuk kulit nanas dan daun alpukat adalah serbuk yang didapat dari kulit nanas dan daun alpukat yang dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari, kemudian diserbuk dengan blender dan diayak menggunakan mesh 40.

Keempat, ekstrak tunggal adalah ekstrak yang diperoleh dari kulit nanas dan daun alpukat yang ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Kelima, bakteri uji adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keenam, kontrol positif adalah kelompok perlakuan yang dapat menghasilkan efek. Kontrol positif digunakan untuk membandingkan pola hambatan dan kemampuan aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol kulit nanas dan daun alpukat terhadap bakteri. Kontrol positif dalam penelitian ini adalah cakram *disk* ciprofloxacin diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Negeri Surakarta.

Ketujuh, kontrol negatif adalah kelompok perlakuan yang tidak dapat menghasilkan efek. Kontrol negatif digunakan untuk membuktikan bahwa DMSO 10% tidak memiliki aktivitas antibakteri. Kontrol negatif dalam penelitian ini adalah DMSO 10% diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Toksikologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri metode difusi adalah metode yang digunakan untuk mengetahui diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri dari kombinasi ekstrak etanol kulit nanas dan daun alpukat. Hasil yang diperoleh dapat berupa sinergis, aditif, atau antagonis.

Kesembilan, uji aktivitas antibakteri metode dilusi adalah metode yang menggunakan antimikroba dengan konsentrasi menurun. Konsentrasi dimulai dari kadar 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09%.

Kesepuluh, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh bakteri dengan mengamati pertumbuhan bakteri pada media yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam yang ditandai dengan ada tidaknya pertumbuhan bakteri.

Kesebelas, kombinasi ekstrak kulit nanas dan daun alpukat dengan perbandingan (1:1) adalah kombinasi yang diperoleh dari 1 KBM kulit nanas ditambahkan 1 KBM daun alpukat.

Keduabelas, kombinasi ekstrak kulit nanas dan daun alpukat dengan perbandingan (1:2) adalah kombinasi yang diperoleh dari 1 KBM kulit nanas ditambahkan 2 KBM daun alpukat.

Ketigabelas, kombinasi ekstrak kulit nanas dan daun alpukat dengan perbandingan (2:1) adalah kombinasi yang diperoleh dari 2 KBM kulit nanas ditambahkan 1 KBM daun alpukat.

Keempatbelas, pita kertas adalah metode yang digunakan menentukan efek kombinasi dari dua senyawa dengan memadukan dua pita yang saling tumpang tindih membentuk huruf "L".

Kelimabelas, pola efek sinergis adalah efek dari kombinasi suatu senyawa memiliki efek lebih besar dibandingkan dengan efek tunggal masing-masing senyawa.

Keenambelas, pola efek antagonis adalah efek dari kombinasi suatu senyawa memiliki efek lebih rendah dibandingkan efek tunggal masing-masing senyawa.

Ketujubelas, pola efek adiktif adalah efek yang terjadi ketika kombinasi senyawa memiliki pengaruh peningkatan efek dari salah satu senyawa tunggal.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : timbangan analitik, ayakan no 40, *blender*, gelas ukur, corong kaca, erlenmeyer, corong pisah, kertas saring, *kain flanel*, cawan porselen, beaker glass, sendok tanduk, labu takar, botol maserasi, tabung reaksi, oven, *vacuum rotary evaporator*, *water bath*, *moisture balance*, lampu spiritus, object glass, cawan petri, jarum ose, vortex mixer, autoklaf, lampu spiritus, inkubator, mikroskop, rak tabung reaksi, penggaris, pinset, batang pengaduk, *aluminium foil*, penjepit kayu, kertas whatman nomor 1 berukuran 0,5x3 cm.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : kulit buah nanas (*Ananas comosus* L) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill), etanol 70%, DMSO 10%, media BHI (*Brain Heart Infusion*), VJA (*Vogel Johnson Agar*), media NA (*Nutrient Agar*), media MHA (*Mueller Hinton Agar*), cakram disk ciprofloxacin, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, asam klorida (HCl) pekat, asam sulfat pekat (H_2SO_4 p), $FeCl_3$, asam asetat (CH_3COOH), amil alkohol, aquadest, kalium tellurite, cat kristal violet, larutan lugol iodine, dan safranin.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman buah nanas (*Ananas comosus* L) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill) bertujuan untuk mengetahui identitas dari tumbuhan yang belum diketahui. Determinasi dilakukan dengan mengamati ciri morfologi buah nanas (*Ananas comosus* L) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill) dengan mendeskripsikan secara mendetail. Determinasi tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengambilan Bahan

Kulit buah nanas diambil dari daerah Blitar, Jawa Timur. Kulit yang diambil merupakan kulit yang masih segar, tidak rusak, dan

terbebas dari penyakit. Daun alpukat diambil secara acak dari daerah Sukoharjo, Jawa Tengah. Daun yang diambil berwarna hijau tua, daun tidak rusak, dan bebas dari penyakit. Kulit buah nanas dan daun alpukat dicuci dengan air mengalir hingga bersih sampai tidak ada debu dan kotoran yang menempel pada kulit buah nanas dan daun alpukat.

3. Pembuatan Serbuk Simplisia

Serbuk simplisia dibuat dengan cara kulit buah nanas dan daun alpukat dibersihkan dengan dialiri air bersih untuk menghilangkan kotoran dan debu. Kulit dan daun yang telah dicuci kemudian ditiriskan, kulit nanas dipotong-potong kecil. Potongan kulit nanas kemudian dijemur di bawah sinar matahari untuk mengeringkannya. Kulit buah nanas dijemur selama beberapa hari hingga kulit buah nanas benar-benar kering, dan menghasilkan simplisia kulit buah nanas (Manaroinsong, 2015). Daun alpukat dikeringkan di bawah sinar matahari sampai daun benar-benar kering. Kulit buah nanas dan daun alpukat dihaluskan dengan blender dan diayak dengan mesh 40 untuk mendapatkan serbuk dengan derajat kehalusan yang cukup homogen. Serbuk simplisia kemudian disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat untuk digunakan dalam penelitian (Azzahra *et al*, 2019).

4. Penetapan Susut Pengerinan Serbuk Kulit Nanas dan Daun Alpukat

Simplisia kulit buah nanas dan daun alpukat masing-masing ditimbang sebanyak 2 g dalam cawan aluminium dangkal yang sebelumnya telah ditara. Ratakan simplisia dalam cawan timbang, kemudian dimasukkan ke dalam *moisture balance*, tutup alat dan keringkan pada suhu 105°C dan nilai susut pengerinan dapat dilihat pada alat (Rosidah *et al.*, 2020).

5. Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Nanas dan Daun Alpukat

Ekstraksi serbuk kulit buah nanas dan daun alpukat dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk kulit nanas dan daun alpukat ditimbang sebanyak 500 g dimasukkan kedalam botol coklat besar kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 5000 mL (1:10 bagian) ditutup dan rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Hasil dari maserasi disaring dan diulangi dengan pelarut yang sama sebanyak 1/2 dari pelarut yang digunakan atau 2500 mL. Ekstrak yang diperoleh kemudian disaring dan dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental. Hitung rendemen yang diperoleh (Kemenkes RI, 2017).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot awal simplisia yang ditimbang (g)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

6. Penetapan Kadar Air Ekstrak Etanol Kulit Nanas dan Daun Alpukat

Penetapan kadar air ekstrak etanol kulit buah nanas dan daun alpukat menggunakan metode gravimetri. Timbang 10 g sampel, kemudian dimasukkan ke dalam kurs yang telah ditara. Panaskan pada oven dengan suhu 105°C selama 5 jam timbang. Lanjutkan pemanasan dan timbang dengan selang waktu 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut - turut tidak lebih dari 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

7. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara esterifikasi yaitu, ekstrak etanol kulit buah nanas dan ekstrak etanol daun alpukat ditambahkan 3 tetes CH₃COOH dan H₂SO₄ pekat yang kemudian dipanaskan. Tidak terciumnya bau khas ester dalam ekstrak kulit buah nanas dan daun alpukat merupakan tanda positif bebas etanol (Kurniawati., 2017).

8. Identifikasi Kandungan Kimia

Identifikasi senyawa kimia dilakukan untuk menentukan kebenaran senyawa kimia yang terkandung pada kulit buah nanas dan daun alpukat berupa flavonoid, alkaloid, tannin, dan saponin dengan menggunakan suatu pereaksi.

8.1 Identifikasi senyawa flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara, sampel 0,1 gram ditambahkan 10 mL air panas, kemudian panaskan selama 5 menit selanjutnya saring dan ambil sebanyak 5 mL filtrat yang didapat ditambah 0,5 gram serbuk Mg, 1 mL HCL pekat dan 1 mL amil alkohol, campuran dikocok kuat dan dibiarkan hingga memisah. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan positif flavonoid (Alamsyah *et al.*, 2014).

8.2 Identifikasi senyawa alkaloid. Identifikasi senyawa alkaloid. Identifikasi senyawa alkaloid dilakukan dengan cara, 0,5 gram ekstrak ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml aquades kemudian dipanaskan selama 2 menit. Fitrat dibagi ke dalam tiga tabung reaksi yang berbeda. Tabung pertama, tambahkan 2-3 tetes reagen Mayer, menunjukkan hasil flavonoid yang positif dengan terbentuknya endapan berwarna putih. Tabung kedua, tambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff , menunjukkan hasil positif dengan

terbentuknya endapan berwarna jingga. Tabung ketiga, tambahkan 2-3 tetes reagen Wagner, menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya endapan berwarna coklat kemerahan (Reiza *et al.*, 2019).

8.3 Identifikasi senyawa tanin. Identifikasi senyawa tanin dilakukan dengan cara, 5 ml filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan FeCl_3 beberapa tetes. Terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru kehitaman menunjukkan hasil positif tanin (Reiza *et al.*, 2019).

8.4 Identifikasi senyawa saponin. 0,5 gram ekstrak kedalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 10mL air panas. Setelah itu, dikocok dengan kuat selama sepuluh detik. Hasil positif saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa stabil selama sepuluh menit setinggi 1 cm, jika asam klorida (HCl) 2N ditambahkan, busa tidak akan hilang (Reiza *et al.*, 2019).

9. Sterilisasi

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian dicuci terlebih dahulu, dikeringkan dan disterilkan menggunakan oven dengan suhu 170-180°C selama 1-2 jam. Kemudian untuk media yang akan digunakan disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Wulandari *et al.*, 2021).

10. Peremajaan Bakteri

Metode gores digunakan untuk meremajakan bakteri. Satu ose bakteri *S. aureus* diambil, kemudian digoreskan pada media *Nutrient Agar* miring secara aseptik. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Yanti dan Mitika 2017).

11. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji *Staphylococcus aureus*

Bakteri *S. aureus* dari biakan murni diambil 1-2 ose kemudian masukkan kedalam media BHI, inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Suspensi diencerkan dengan Natrium klorida 0,9% hingga didapat kekeruhan yang sesuai dengan standar *McFarland* $0,5 \times 10^8$ CFU per mililiter. Suspensi bakteri diencerkan sebanyak 1:1000 untuk pengujian dilusi.

12. Identifikasi Bakteri Uji *Staphylococcus aureus*

12.1 Identifikasi bakteri secara makroskopis. Biakan bakteri *S. aureus* digoreskan pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA), yang telah ditambahkan kalium tellurit 3% sebanyak tiga tetes pada cawan petri, media diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37° C. Hasil positif ditandai dengan koloni berwarna hitam dan media sekitar koloni

berwarna kuning. Koloni berwarna hitam disebabkan bakteri *S. aureus* dapat mereduksi kalium telurit menjadi metalik telurium. Terbentuknya warna kuning di sekitar koloni disebabkan bakteri dapat memfermentasi manitol menjadi asam, dengan indikator fenol merah dalam larutan asam (Elvira *et al.*, 2017).

12.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram pada bakteri *S. aureus* menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodin sebagai mordan), Gram C (alkohol – aseton 1:1 sebagai peluntur), Gram D (safranin sebagai cat penutup). Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara suspensi bakteri *S. aureus* diambil dari media dengan ose, kemudian diratakan diatas objek glass dan ditunggu sampai kering atau dapat difiksasi di atas api. Kemudian koloni bakteri ditetesi dengan kristal violet, dibiarkan 60 detik dan dibilas dengan air mengalir, kemudian ditetesi dengan lugol iodin, dibiarkan 60 detik dan dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian preparat dicuci dengan larutan alkohol-aseton selama 15 sampai 30 detik dan dicuci dengan air mengalir, kemudian ditetesi dengan safranin selama 60 detik kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Hasil positif *S. aureus* ditunjukkan dengan bakteri berbentuk bulat bergerombol dan berwarna ungu saat diamati dibawah mikroskop (Elvira *et al.*, 2017).

12.3 Identifikasi biokimia. Identifikasi secara biokimia ada 2 yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase merupakan uji untuk membedakan spesies *Staphylococcus* sp. dan *Streptococcus* sp. Larutan H₂O₂ 3% sebanyak 1 tetes ditetaskan pada object glass dan ambil satu ose koloni bakteri dari media nutrient cair. Uji katalase positif ditunjukkan adanya gelembung gas (O₂) yang diproduksi oleh genus *Staphylococcus*.

Uji koagulase dilakukan menggunakan 1 mL plasma darah kelinci dan asam sitrat yang telah diencerkan (1:5), tambahkan satu ose biakan bakteri, dan diinkubasi pada suhu 37°C. Untuk mengetahui apakah ada penggumpalan, amati tabung reaksi selama 1-4 jam. Gumpalan seperti gel menunjukkan hasil positif uji koagulase (Hayati *et al.*, 2019).

13. Pengujian aktivitas antibakteri metode dilusi

Pengujian aktivitas secara dilusi digunakan untuk menentukan atau mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada sampel. Pengujian dilusi menggunakan 12 tabung steril. Metode ini secara aseptis dibuat seri

konsentrasi yang dimulai dari 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09%; kontrol (-) dan kontrol (+).

Tabung pertama berfungsi sebagai kontrol negatif, dengan 2 mL larutan uji (ekstrak), dan tabung 12 berfungsi sebagai kontrol positif, dengan suspensi bakteri *S. aureus* 2 mL. Media BHI ditambahkan 1 mL ke setiap tabung reaksi kecuali tabung 1. Tabung 2 dan tabung 3 ditambahkan 1 mL larutan ekstrak, lalu dihomogenkan, kemudian pipet 1 mL dari tabung 3 dimasukkan kedalam tabung 4 dan dihomogenkan. Tabung 4 sampai tabung 11 dilakukan dengan cara yang sama. Tabung 11 dipipet 1 mL untuk dibuang. Selanjutnya masukkan suspensi bakteri *S. aureus* sebanyak 1 mL pada tabung ke 2 sampai ke 11. Setelah itu, setiap tabung diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan amati kekeruhan di dalamnya. KBM didapat diketahui dengan cara pada tabung media yang berisi konsentrasi di gores pada media VJA kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak ditunjukkan dengan adanya daerah yang tidak ditumbuhi oleh koloni bakteri dan diambil dari konsentrasi terkecil dengan batas daerah terakhir yang tidak ditumbuhi koloni. Lakukan 3 kali replikasi.

14. Pembuatan Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Nanas dan Daun Alpukat

14.1 Pembuatan kombinasi ekstrak etanol kulit nanas dan daun alpukat perbandingan 1:1. Pembuatan kombinasi perbandingan 1:1 dilakukan dengan mengambil mengambil ekstrak etanol kulit nanas sebanyak 0,125 gr dan dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10% dan diambil ekstrak etanol daun alpukat sebanyak 0,25 gr kemudian dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10%. Kedua ekstrak yang telah dilarutkan kemudian dipipet masing-masing 1 mL dan di homogenkan.

14.2 Pembuatan kombinasi ekstrak etanol kulit nanas dan daun alpukat perbandingan 1:2. Pembuatan kombinasi perbandingan 1:2 dilakukan dengan mengambil mengambil ekstrak etanol kulit nanas sebanyak 0,125 gr dan dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10% dan diambil ekstrak etanol daun alpukat sebanyak 0, 5 gr kemudian dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10%. Kedua ekstrak yang telah dilarutkan kemudian dipipet masing-masing 1 mL dan di homogenkan.

14.3 Pembuatan kombinasi ekstrak etanol kulit nanas dan daun alpukat perbandingan 2:1. Pembuatan kombinasi perbandingan 2:1 dilakukan dengan mengambil mengambil ekstrak etanol kulit nanas

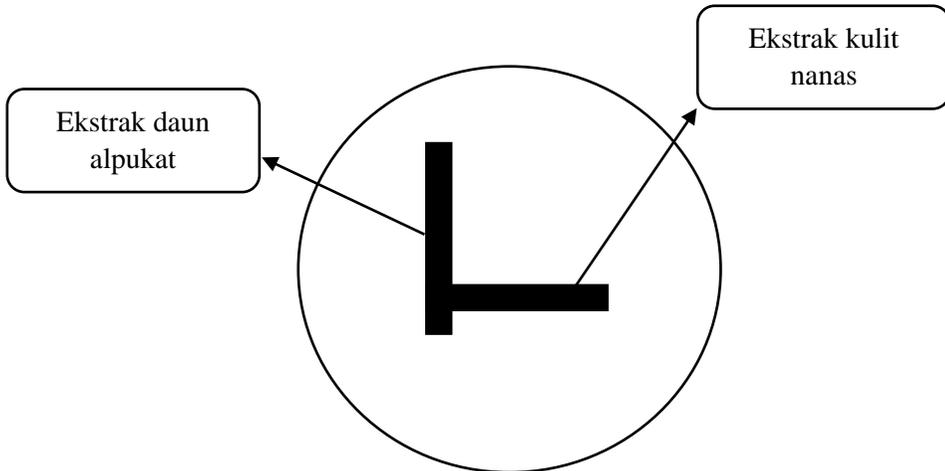
sebanyak 0,25 gr dan dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10% dan diambil ekstrak etanol daun alpukat sebanyak 0,25 gr kemudian dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10%. Kedua ekstrak yang telah dilarutkan kemudian dipipet masing-masing 1 mL dan dihomogenkan.

15. Pengujian aktivitas antibakteri metode difusi cakram

Pengujian aktivitas secara difusi cakram digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Metode difusi menggunakan kertas cakram dan kombinasi ekstrak etanol kulit nanas dan daun alpukat dengan perbandingan (1:1);(1:2);(2:1), kontrol negatif menggunakan DMSO 10%, dan kontrol positif menggunakan ciprofloxacin. Suspensi *S. aureus* dari media BHI disebarkan dalam cawan petri berisi media MHA menggunakan kapas lidi steril dan tunggu sampai bakteri terdifusi pada media. Masing-masing larutan uji dipipet sebanyak 50 µl teteskan pada kertas cakram dan letakkan di atas media inokulum. Hal yang sama dilakukan terhadap kontrol positif ciprofloxacin dan kontrol negatif DMSO 10% yang terbukti tidak memiliki hambatan. Cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona bening di sekitar cakram kertas diukur dengan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm) untuk mengetahui diameter hambat bakteri uji. Lakukan 3 kali replikasi (Andriani *et al.*, 2016). Lakukan 3 kali replikasi.

16. Penentuan pola efek kombinasi ekstrak dengan metode difusi agar menggunakan pita kertas

Suspensi bakteri disebarkan pada media MHA menggunakan kapas lidi steril. Pengujian ini menggunakan pita kertas steril yang berukuran 0,5x3 cm (kertas whatman no 1). Satu pita kertas steril ditetesi 50 µL ekstrak etanol kulit nanas dan 1 kertas ditetesi 50 µL ekstrak etanol daun alpukat dan tunggu selama 5 menit. Pita kertas yang sudah ditetesi ekstrak kemudian diletakkan di atas media yang mengandung bakteri uji, dengan posisi tegak lurus dipermukaan agar serta posisi tegak lurus salah bagian ujung tumpang tindih pada satu titik terbentuk huruf "L" atau membentuk sudut 90°. Cawan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hambatan pada pertemuan kedua pita kertas tersebut kemudian diamati (Novitri dan Kurniati, 2021). Pertemuan kedua pita menghasilkan efek kombinasi yang ditentukan dari pola hambat pertumbuhan mikroba yang membentuk sekeliling pita kertas berupa daerah bening.



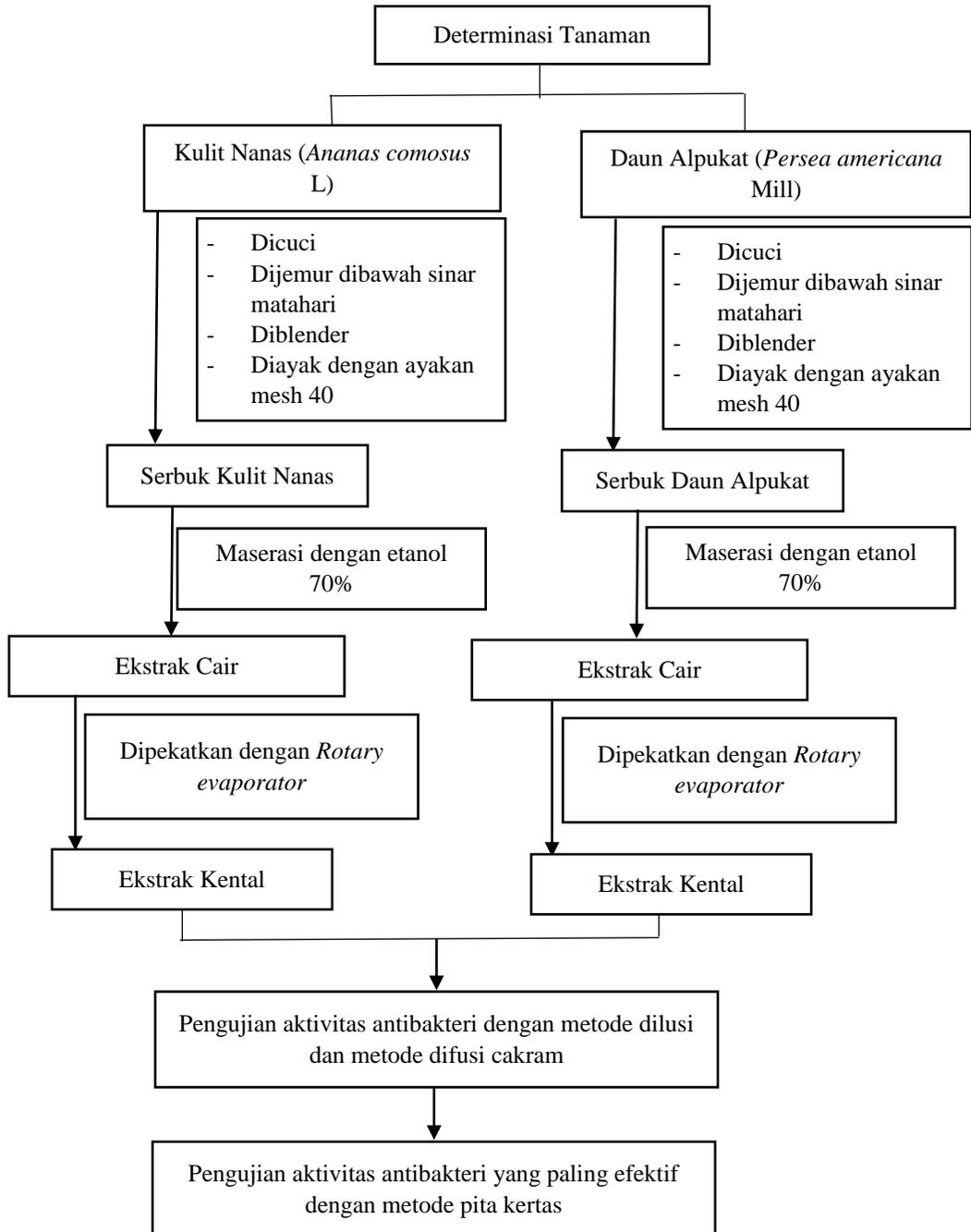
Gambar 5. Pola kombinasi ekstrak kulit nanas dan daun alpukat

E. Analisis Hasil

Analisis hasil dari penelitian ini adalah dengan membandingkan ekstrak tunggal kulit buah nanas dan daun alpukat dengan kombinasi ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Data yang dihasilkan dianalisis dengan menggunakan software SPSS versi 25. Uji yang dilakukan untuk melihat apakah data terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan Saphiro wilk. Uji untuk melihat apakah data homogen atau tidak menggunakan Levene. Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA), dan jika data tidak terdistribusi normal, digunakan uji Kruskal Wallis.

F. Skema Penelitian

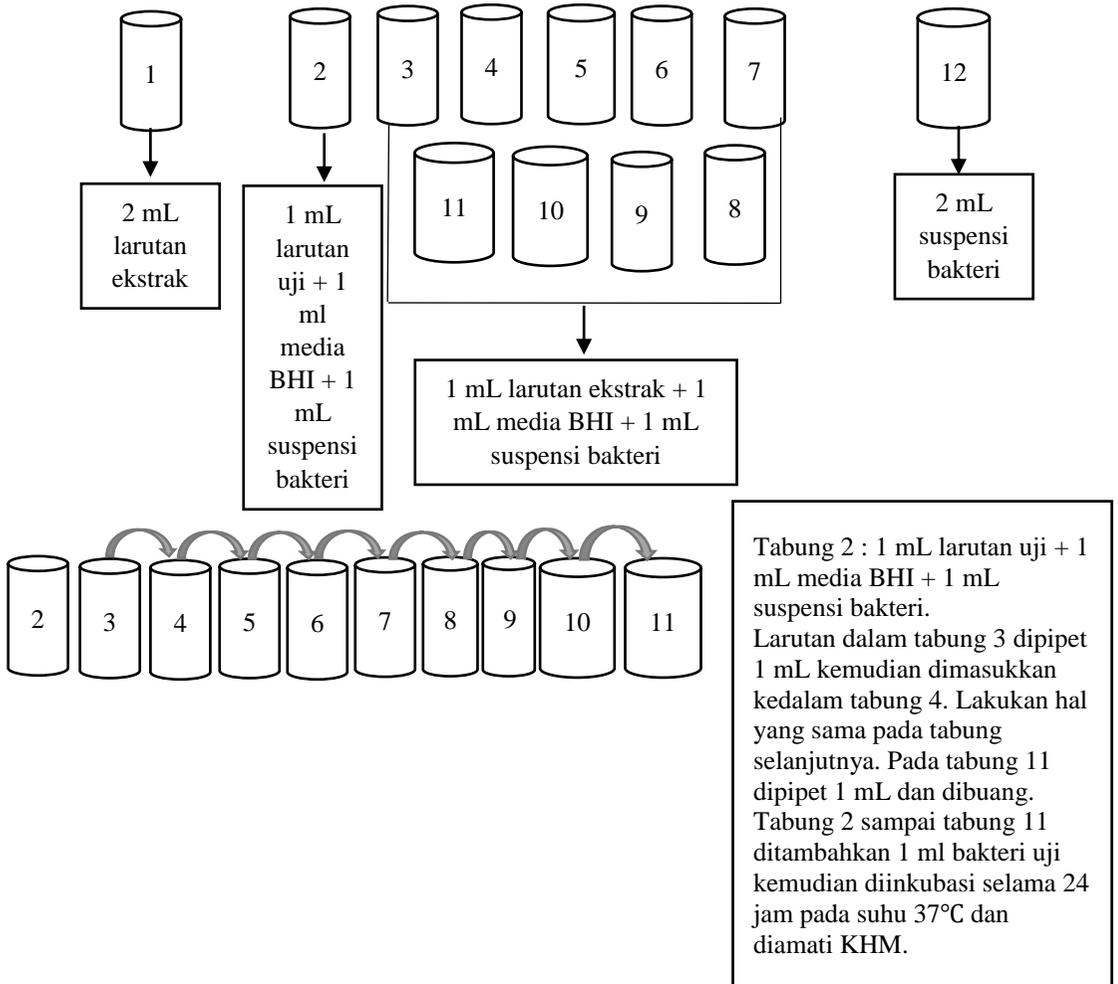
1. Ekstraksi Kulit Nanas dan Daun Alpukat



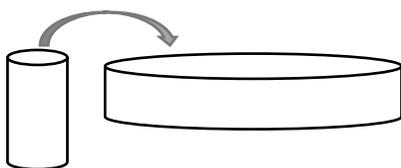
Gambar 6. Skema Jalannya Penelitian

2. Uji Aktivitas Antibakteri Metode Dilusi

a. Konsentrasi Hambat Minimum



b. Konsentrasi Bunuh Minimum

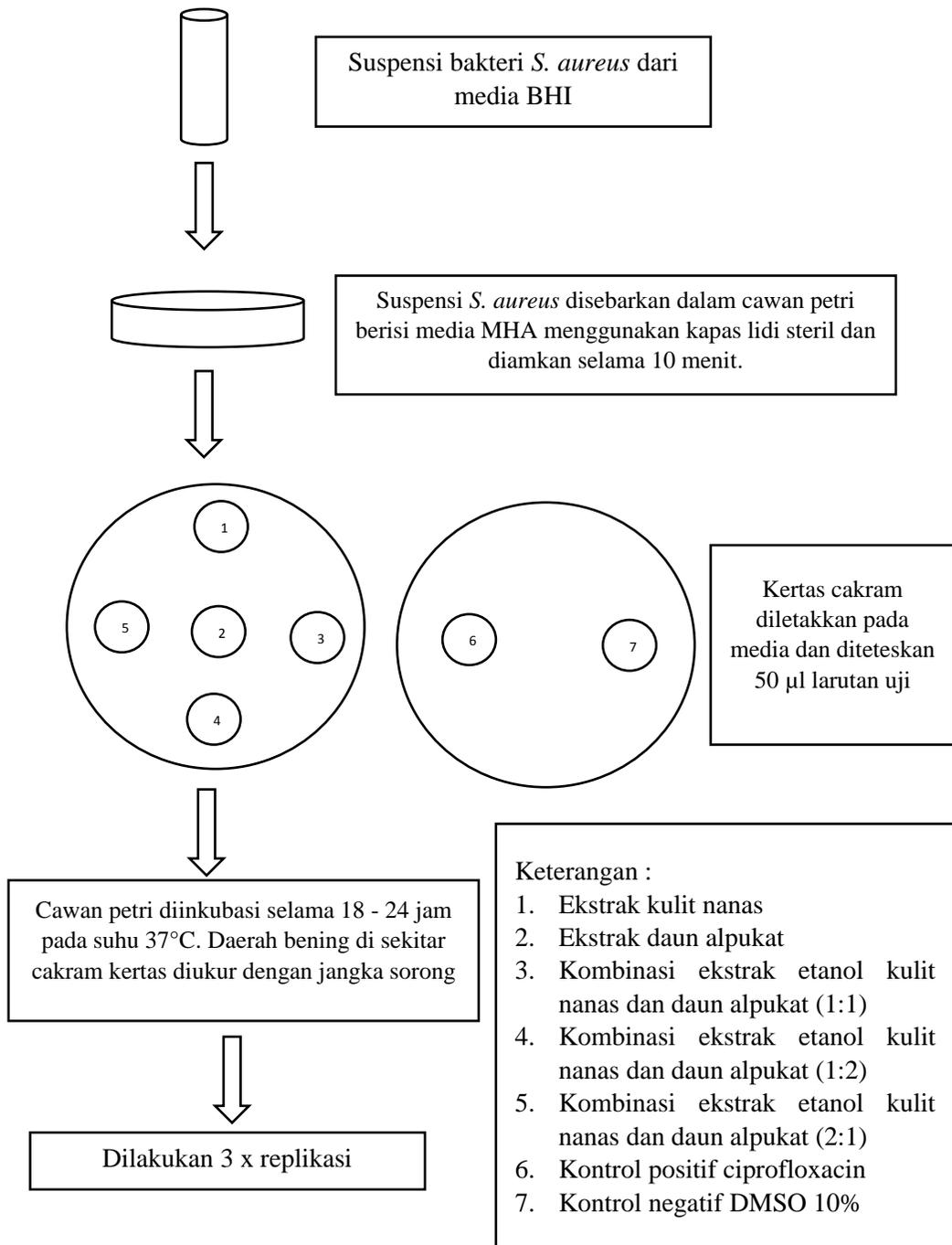


Pada tabung media yang berisi konsentrasi diinokulasi secara goresan pada media VJA lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak ditunjukkan dengan adanya daerah yang tidak ditumbuhi oleh koloni bakteri.

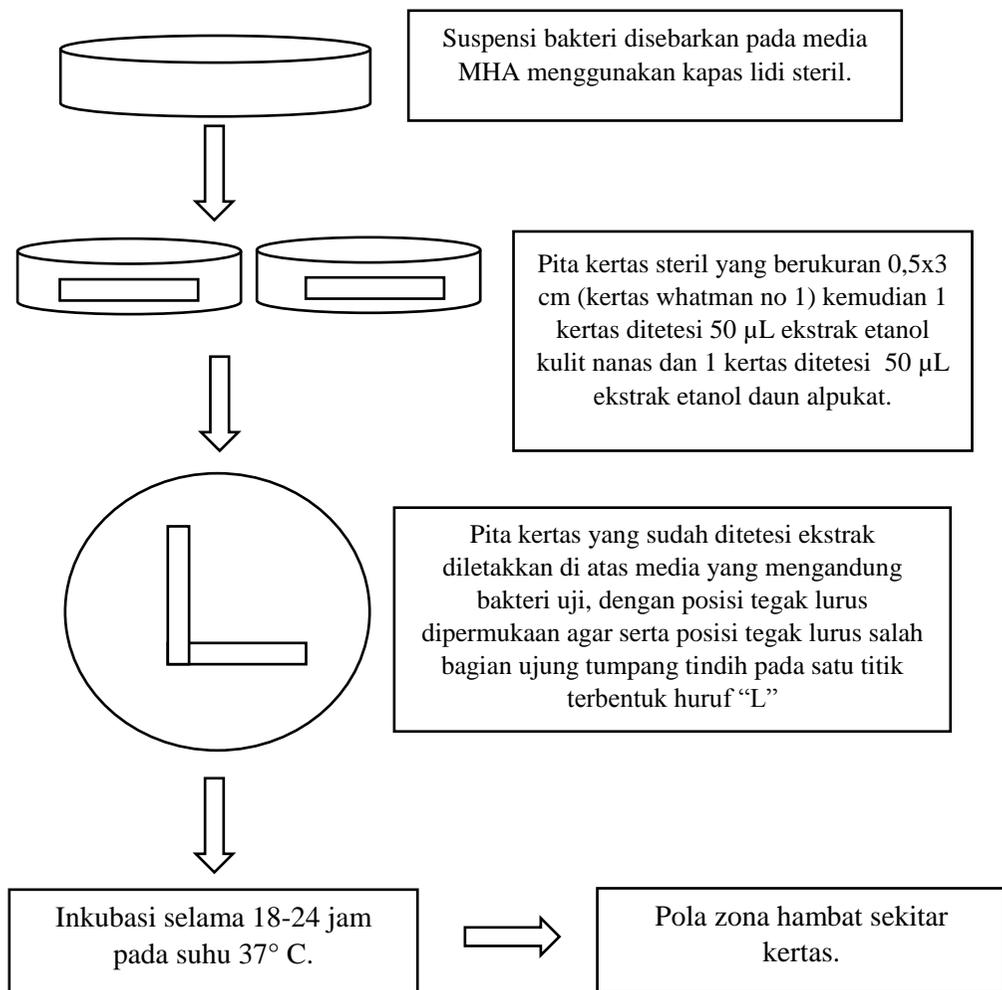
Gambar 7. Pengujian Aktivitas Antibakteri Metode Dilusi

3. Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi



Gambar 8. Pengujian Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Cakram

4. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Pita Kertas



Gambar 9. Pengujian Aktivitas Antibakteri Metode Pola Pita