

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi Sampel

1. Populasi

Populasi penelitian ini melibatkan daun laruna dan daun sirsak sebagai obyek utama. Daun-daun ini diambil dari wilayah Manggarai, Flores, Nusa Tenggara Timur, menjadi fokus penelitian untuk menggambarkan karakteristik dan kandungan senyawa aktif yang mungkin dimiliki oleh daun-daun tersebut.

2. Sampel

Dalam penelitian ini, sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang diambil dari daun sirsak dan daun laruna. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari untuk memastikan ke segaran daun, mengingat pada waktu tersebut minim penguapan. Fokus pengambilan sampel pada bagian daun yang tidak terlalu tua, khususnya daun yang berada dekat dengan pucuk, yaitu sekitar 5-8 daun ke bawah pucuk. Pemilihan bagian ini diharapkan dapat memberikan representasi yang baik terhadap kandungan senyawa aktif yang ada dalam daun.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama adalah ekstrak etanol kombinasi dari daun laruna dan daun sirsak.

Variabel utama kedua adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol kombinasi tersebut terhadap *S.aureus* ATCC 25923.

Variabel utama ketiga melibatkan kombinasi ekstrak etanol dengan perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1 dari daun laruna dan daun sirsak terhadap *S.aureus*. Penelitian ini bertujuan untuk memahami dampak variasi konsentrasi dan perbandingan kombinasi terhadap aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S.aureus*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini dapat dikelompokkan menjadi beberapa jenis variabel, seperti variabel bebas yang merupakan faktor yang sengaja dimanipulasi atau diubah untuk melihat dampaknya. Di sisi lain, variabel terkontrol adalah faktor-faktor yang tetap tidak berubah selama eksperimen untuk menjaga konsistensi dan validitas hasil. Sementara itu, variabel terikat adalah hasil atau

respons yang diukur dan diamati sebagai akibat dari perubahan pada variabel bebas. Melalui pengkategorian ini, penelitian dapat dilaksanakan dengan lebih terstruktur dan memungkinkan analisis yang lebih mendalam terhadap hubungan antarvariabel.

2.1 Variabel Bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini merujuk pada faktor yang sengaja diubah atau dimanipulasi untuk memahami dampaknya terhadap variabel tergantung. Dalam konteks ini, variabel bebas adalah variasi konsentrasi kombinasi ekstrak etanol dari daun laruna dan daun sirsak. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi bagaimana perubahan konsentrasi kombinasi tersebut dapat memengaruhi aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus*, sehingga dapat memberikan wawasan tentang potensi pengaruh dosis terhadap efektivitasnya.

2.2 Variabel Terkendali. Variabel terkendali merupakan faktor-faktor yang dapat memengaruhi variabel tergantung, oleh karena itu, perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil penelitian dapat konsisten dan dapat diulang dengan tepat. Dalam penelitian ini, variabel terkendali melibatkan bakteri *S.aureus*, media pertumbuhan, waktu panen bahan baku (daun laruna dan daun sirsak), kondisi laboratorium, dan peneliti sebagai faktor-faktor yang dapat diatur dan dikendalikan untuk memastikan validitas dan reproduktivitas penelitian.

2.3 Variabel Tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah fokus utama yang menjadi pusat perhatian. Pada penelitian ini, variabel tergantung adalah aktivitas antibakteri dari kombinasi ekstrak etanol daun laruna dan daun sirsak terhadap *S.aureus*, yang dinilai berdasarkan diameter zona hambat dan pola kombinasi yang terbentuk. Variabel ini mencerminkan respons atau efek dari perlakuan terhadap bakteri, dan pengukuran diameternya serta pola kombinasinya menjadi indikator utama dalam mengevaluasi efektivitas kombinasi ekstrak terhadap bakteri yang diteliti.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun laruna yang digunakan dalam penelitian ini dipetik di wilayah Manggarai, Flores, Nusa Tenggara Timur. Pemilihan daun didasarkan pada karakteristik populasi, dengan sampel daun berwarna hijau tua yang tidak terlalu matang, yakni daun yang terletak dekat dengan pucuk sekitar 5-8 helai di bawah pucuk. Selain itu, daun yang digunakan dalam penelitian ini dipastikan segar dan bebas dari penyakit serta hama.

Kedua, daun sirsak yang digunakan berasal dari daerah Manggarai, Flores, Nusa Tenggara Timur, dengan karakteristik yang diutamakan adalah kesegaran, warna hijau yang masih terjaga, dan bebas dari penyakit.

Ketiga, setelah dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, daun laruna dan daun sirsak dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C. Selanjutnya, kedua daun tersebut diubah menjadi serbuk dengan menggunakan alat blender dan disaring menggunakan ayakan nomor 60.

Keempat, ekstrak tunggal dari daun laruna dihasilkan melalui metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak ini kemudian diuapkan hingga menjadi ekstrak kental, sesuai dengan prosedur yang tertera dalam Farmakope Herbal Indonesia.

Kelima, proses pembuatan ekstrak tunggal daun sirsak juga mengikuti metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental, sesuai dengan pedoman Farmakope Herbal Indonesia.

Keenam, bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *S.aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketujuh, kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah gentamicin, sementara kontrol negatifnya adalah DMSO 10%, yang berfungsi sebagai pengencer dalam pembuatan konsentrasi kombinasi.

Kesembilan, metode uji yang diterapkan adalah uji dilusi, bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi menurun mulai dari yang terbesar (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3%, 1,5%, 0,7%, hingga 0,3%).

Kesepuluh, diameter zona hambat diukur sebagai zona bening di sekitar cakram yang berisi sampel.

Kesebelas, kombinasi ekstrak daun laruna dan daun sirsak dengan perbandingan (1:1) yang diperoleh dari 1 KBM daun laruna dan 1 KBM daun sirsak.

Keduabelas, kombinasi ekstrak daun laruna dan daun sirsak dengan perbandingan (1:2) yang diperoleh dari 1 KBM daun laruna dan 2 KBM daun sirsak.

Ketigabelas, kombinasi ekstrak daun laruna dan daun sirsak dengan perbandingan (2:1) yang diperoleh dari 2 KBM daun laruna dan 1 KBM daun sirsak.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Tabung reaksi, botol besar berwarna coklat (gelap), objek glass, timbangan analitik, oven, inkas, gelas ukur, bunsen, kapas lidi steril, sterling bidwell, mikro pipet, mikroskop, ayakan mesh no 60, cawan petri, waterbath, erlenmeyer, rotary evaporator, corong kaca, jarum ose, inkubator, objek glass, autoklaf, pinset, corong kaca, hotplate, kaca arloji, tabung reaksi, cawan porselen, moisture balance.

2. Bahan

Daun laruna, daun sirsak, etanol 96% (Merck), gentamicin, DMSO 10%, hidrogen peroksida, larutan mayer, cakram disk antibiotik, kertas whatman nomor 1, larutan Dragendorff, larutan FeCl_3 1%, asam asetat pekat (CH_3COOH), aquadest, asam sulfat pekat (H_2SO_4), asam klorida pekat (HCl), serbuk magnesium, amil alkohol, media Mueller Hilton Agar (MHA) (Merck), bakteri *S.aureus*, NaCl 0,9%, Mannitol Salt Agar (MSA) (Merck), media nutrient agar (NA), safranin, crystal violet, lugol, mayer, asam asetat anhidrat ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$), Mc Farland 0.5, Nutrient Broth (NB), Burchard.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Langkah yang dilakukan sebelum penelitian adalah mengidentifikasi daun laruna dan daun sirsak. Determinasi ini dilakukan untuk memastikan keaslian sampel yang sesuai dengan ciri morfologi tumbuhan yang dilakukan di di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan

Jurusan Biologi FMIPA UNPAD dan sampel daun sirsak dilakukan di Balai Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Pengambilan Bahan

Daun laruna dan daun sirsak dipetik pada saat pagi hari di wilayah Manggarai, Flores Nusa Tenggara Timur. Daun laruna dan daun sirsak yang diambil pada pagi hari dengan daun dengan warna hijau tua, daun tidak rusak dan terhindar dari hama penyakit. Kedua daun dicuci dibawah air mengalir sampai bersih yang ditunjukkan dengan hilangnya kotoran atau debu yang melekat pada daun.

3. Pembuatan Serbuk

Daun laruna dan daun sirsak yang sudah bersih lalu dianginkan sampai tidak ada airnya kemudian dioven dengan temperatur 50°C ,

bahan yang sudah kering masing-masing diserbuk dengan blender sampai mendapat serbuk halus dengan pengayak no mesh 60.

4. Pengujian Kadar Air Serbuk Daun Laruna dan Daun Sirsak

Pengujian kadar air dalam penelitian ini, dilakukan menggunakan alat destilasi Sterling Bidwell dan oven. Sebanyak 10 gram serbuk simplisia atau ekstrak dimasukkan ke dalam labu destilasi bersama dengan toluena yang telah dijenuhkan dengan air hingga terjadi pemisahan fase. Selanjutnya, alat destilasi Sterling Bidwell dipasang dengan kondensor, dan dipanaskan hingga tidak terdapat air yang menetes dalam tabung berskala. Volume air yang dihasilkan pada skala yang ada di alat ditetapkan dalam satuan persen sebagai kadar air serbuk (Depkes, 2017).

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{volume air destilasi (mL)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\%$$

5. Penetapan Susut Pengerinan Serbuk dan Ekstrak

Penetapan susut pengerinan sebagai berat konstan bahan setelah pengerinan. Penetapan susut pengerinan serbuk daun laruna dan daun sirsak lalu menimbang sebanyak 2 g letakan cawan aluminium dalam moisture balance. Kemudian dipanaskan pada suhu 105⁰ Celcius sampai menghasilkan beratnya tetap (Depkes,2000).

6. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Laruna dan Daun Sirsak

Pembuatan ekstrak pada penelitian ini, ekstrak dibuat menggunakan metode maserasi. Serbuk daun Laruna dan daun Sirsak masing-masing dituang ke dalam botol gelap yang berbeda dan diisi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan (1:10), lalu rendam selama 6 jam pertama dengan cara beberapa kali, lalu diamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara penyaringan. Ulangi prosedur ekstraksi dengan pelarut yang sama dan setengah volume prosedur ekstraksi dengan pelarut yang sama dan setengah volume pelarut untuk ekstraksi pertama. Maserat yang dihasilkan kemudian dikumpulkan dan dipekatan pada rotary evaporator pada suhu 65⁰C (Depkes, 2017).

7. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara sterifikasi alkohol pada ekstrak daun Laruna dan daun Sirsak. Proses ini melibatkan penambahan asam asetat dan asam sulfat pekat, diikuti dengan tahap pemanasan. Jika tidak terdeteksi bau khas ester, hal ini menandakan bahwa tidak ada alkohol yang tersisa pada ekstrak daun Laruna dan daun Sirsak. Tujuan dari pengujian bebas etanol adalah untuk

menghilangkan etanol dari ekstrak, menghasilkan ekstrak murni. Selain itu, mengingat pelarut etanol memiliki sifat antibakteri dan antijamur, ketiadaan kandungan etanol akan mencegah terjadinya hasil positif palsu pada pengujian, sesuai dengan penjelasan yang disampaikan oleh Kurniawati (2015).

8. Pengujian Kandungan Kimia

Pengujian kandungan kimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun Laruna dan daun Sirsak. Identifikasi senyawa tersebut dilaksanakan di Laboratorium Analisis Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

8.1. Identifikasi Flavonoid. Sampel ekstrak dan serbuk sebanyak 0,5 g ditambahkan ke dalam 100 ml air, kemudian direbus selama 5 menit. Setelah itu, campuran disaring, dan filtratnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Serbuk magnesium, 1 ml asam klorida, dan 2 ml amil alkohol ditambahkan ke dalam tabung reaksi tersebut, lalu dikocok kuat dan dibiarkan hingga terjadi pemisahan. Terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid positif, sesuai dengan metode yang dijelaskan oleh Sarker et al. (2006).

8.2. Identifikasi Alkaloid. Sampel ekstrak dan serbuk sebanyak 0,5 g dicampur dengan 1 mL asam klorida 2N dan 9 ml air. Campuran dipanaskan selama 2 menit, lalu disaring ke dalam tabung reaksi. Filtrat sebanyak 3 ml dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi, dan masing-masing tabung ditambahkan 2 tetes pereaksi Burchard dan Meyer. Keberadaan alkaloid akan terindikasi dengan terbentuknya endapan putih atau kuning pada pereaksi Meyer, sementara pada pereaksi Burchard akan terbentuk endapan berwarna coklat hingga hitam, sesuai dengan metode yang dijelaskan oleh Depkes (1995).

8.3. Identifikasi Saponin. Sampel ekstrak dan serbuk 0,5 g pada tabung reaksi, tambahkan 10 ml air panas, dinginkan dan kocok kuat-kuat selama 10 detik (jika zat yang akan diuji ialah sediaan cair, kemudian encerkan 1 ml zat yang akan diuji dengan 10 ml larutan air dan kocok kuat-kuat selama 10 menit). Reaksinya positif jika busa padat yang terbentuk, bertahan setidaknya selama 30 detik dan tingginya 1 cm hingga 10 cm. Tambahkan 1 tetes asam klorida 2N busa tebal tidak hilang (Depkes, 1979).

8.4. Identifikasi Tanin. Sampel ekstrak dan serbuk 0,5 g yang telah dihaluskan, ditambah aquadest, setelah itu dipanaskan diadkan 3 menit lalu. Kemudian 1 ml larutan dipindahkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 . Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau (Depkes,1995).

8.5. Identifikasi Minyak Atsiri. Ekstrak dan serbuk sebanyak 0,5 g diencerkan dengan 1 ml pelarut etanol kemudian dipanaskan di atas hotplate pada kaca arloji sampai diperoleh residu. Hasil positif untuk minyak atsiri ditandai dengan bau khas yang dihasilkan oleh residu (Rukmini *et al.*,2020).

8.6. Identifikasi Triterpenoid/Steroid. Ekstrak dan serbuk sebanyak 0,5 g tambahkan 2 ml kloroform ke dalam ekstrak dan tambahkan 10 tetes asam asetat anhidrat, lalu teteskan 3 tetes H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung reaksi. Terbentuknya cincin berwarna kecoklatan atau violet pada tepi kedua pelarut menunjukkan terpenoid. Jika munculnya warna hijau menunjukkan steroid positif (Nugrahani *et al.*,2016).

9. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan menggunakan metode gores. Biakan murni bakteri *S.aureus* diambil satu ose kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada media NA secara aseptik. Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Yanti dan Mitika, 2017).

10. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji *Staphylococcus aureus*

Bakteri uji *S.aureus* ditampung pada media biakan murni Nutrient Agar (NA) pada temperatur 37°C selama 24 jam. Selanjutnya pembuatan suspensi sebanyak 2 ose dari koloni yang serupa dan melarutkannya secara aseptik pada media BHI, kemudian di inkubasi kembali selama 24 jam. Bakteri yang diuji dari media cair diambil 2-3 ose dimasukkan dalam larutan NaCl 0,9% kemudian dihomogenkan. Kekeruhan suspensi terkoreksi standar MC Farland ialah 0,5 yang dianggap setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Hayati *et al.*, 2019).

11. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

11.1. Uji media selektif. Kultur murni bakteri *S.aureus* diinokulasikan secara digoreskan pada media Mannitol Salt Agar (MSA) dengan media cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C . Hasil positif ini menunjukkan dengan adanya perubahan warna pada media yang awalnya tersebut merah menjadi kuning dan warna koloni berwarna kuning (Toelle dan Lenda, 2014).

11.2 Uji Pewarnaan Gram. Mengambil satu ose koloni bakteri yang diletakkan pada glass obyek dan difiksasi di atas lampu bunsen. Preparat sudah kering ditetesi kristal violet (Gram A) 2- 3 tetes sebagai pewarna primer pada preparat hingga seluruh ulasan terwarnai, kemudian didiamkan sampai kurang lebih 1 menit. Preparat dibilas dengan aquades kemudian ditetesi dengan larutan lugol (Gram B), didiamkan dengan waktu kurang lebih selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C (alkohol 96%) dan didiamkan dengan waktu kurang lebih selama 30 detik, kemudian ditetesi dengan Gram D (safranin) dan didiamkan selamanya 2 menit. Kemudian dibilas dengan aquades mengalir, kemudian preparat dikeringkan dengan tisu yang ditempelkan pada sisi ulasan kemudian dibiarkan sampai kering dan diperiksa di bawah mikroskop dengan lensa perbesar 100x (Volk dan Wheller, 1988). *S.aureus* Gram positif bila sel bakteri berbentuk coccus atau bulat, susunan bergerombol seperti anggur yang berwarna ungu.

11.3 Uji Katalase. Mengambil bakteri sebanyak satu ose kemudian digoreskan pada objek glass. Uji ini menggunakan cara meneteskan 2 tetes hidrogen peroksida 3% pada gelas objek yang bersih. Biakan bakteri uji disebarakan pada gelas objek yang sudah ditetesi hidrogen peroksida. Hasil dinyatakan positif jika muncul gelembung yaitu pelepasan oksigen (Jawetz *et al.*, 2007).

11.4 Uji Koagulase. Memasukkan 1 ml plasma kelinci kedalam suspensi 1 ml BHI dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diamati adanya gumpalan setelah 4 jam atau lebih. Hasil positif ditunjukkan jika terbentuk dalam gumpalan seperti gel didalam tabung (Hayati *et al.*, 2019).

12. Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan kombinasi ekstrak daun laruna dan daun sirsak ditentukan berdasarkan uji pendahuluan dengan konsentrasi 6,25% dan 12,5% b/v, dengan penimbangan 0,3125 gram/5 mL dan 0,625 gram/5 mL yang kemudian dilarutkan menggunakan DMSO 10% sampai volume 5 mL, dibuat dengan perbandingan 1:1, 1:2 dan 2:1 dengan konsentrasi 6,25%:6,25%, 6,25%:12,5% dan 12,5%:6,25%.

13. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Dilusi

Uji dilusi dilakukan pada daun laruna dan daun sirsak untuk menentukan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). Metode dilusi ini menggunakan 10

tabung steril dengan pendekatan aseptis. Deret konsentrasi dibuat, mulai dari kontrol negatif; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3%; 1,5%, 0,7%, 0,3% ; dan kontrol positif. Media BHI dimasukkan 0,5 ml pada setiap tabung reaksi kecuali pada tabung pertama. Tabung pertama diberi larutan ekstrak sebanyak 1 ml, kemudian pada tabung kedua dan ketiga diberi larutan ekstrak sebanyak 0,5 ml. Selanjutnya dipipet 0,5 ml dari tabung ketiga dan dimasukkan kedalam tabung keempat kemudian dihomogenkan hingga merata, begitu seterusnya sampai tabung ke 9 lalu dibuang. Selanjutnya masukkan suspensi bakteri *S.aureus* sebanyak 0,5 ml pada tabung ke 2 sampai ke 9. Kemudian semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan amati kekeruhan yang terjadi didalam tabung. KBM dapat diketahui dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Inokulasi dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri dari *S.aureus*. Tabung jernih dengan konsentrasi terendah dinyatakan sebagai konsentrasi hambat minimum (KHM). Konsentrasi dari ekstrak yang dapat membunuh bakteri ditunjukkan dengan adanya daerah yang tidak ditumbuhi oleh koloni bakteri. Konsentrasi ekstrak tersebut dapat dikatakan sebagai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

14. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi (metode cakram)

Metode pengujian yang dilakukan adalah metode difusi cakram, yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta. Cara pengujian dilakukan dengan cara memasukkan lidi steril ke dalam suspensi bakteri yang telah dibuat dan diinokulasikan (swab) ke media MHA dan didiamkan pada temperatur ruang (25⁰C) selama 10 menit untuk suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Uji aktivitas antibakteri menggunakan kertas cakram 6 mm yang kemudian kertas cakram diletakkan yang sudah di swab pada bakteri uji dan ekstrak kombinasi ditetaskan dengan mikropipet kedalam kertas cakram dengan volume tertentu. Kemudian kertas cakram diletakkan pada cawan petri yang berisi media MHA. Cawan petri kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Masa inkubasi selama 24 jam bertujuan untuk mengetahui diameter zona hambat yang terbentuk disekitar cakram ditandai dengan adanya daerah bening atau jernih.

Konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk kedua bahan adalah 5%, dengan perbandingan ekstrak daun Laruna dan daun Sirsak adalah

(1:1), (1:2), dan (2:1). Sebagai kontrol positif digunakan amoksisilin, sementara kontrol negatif menggunakan DMSO (Depkes, 1995).

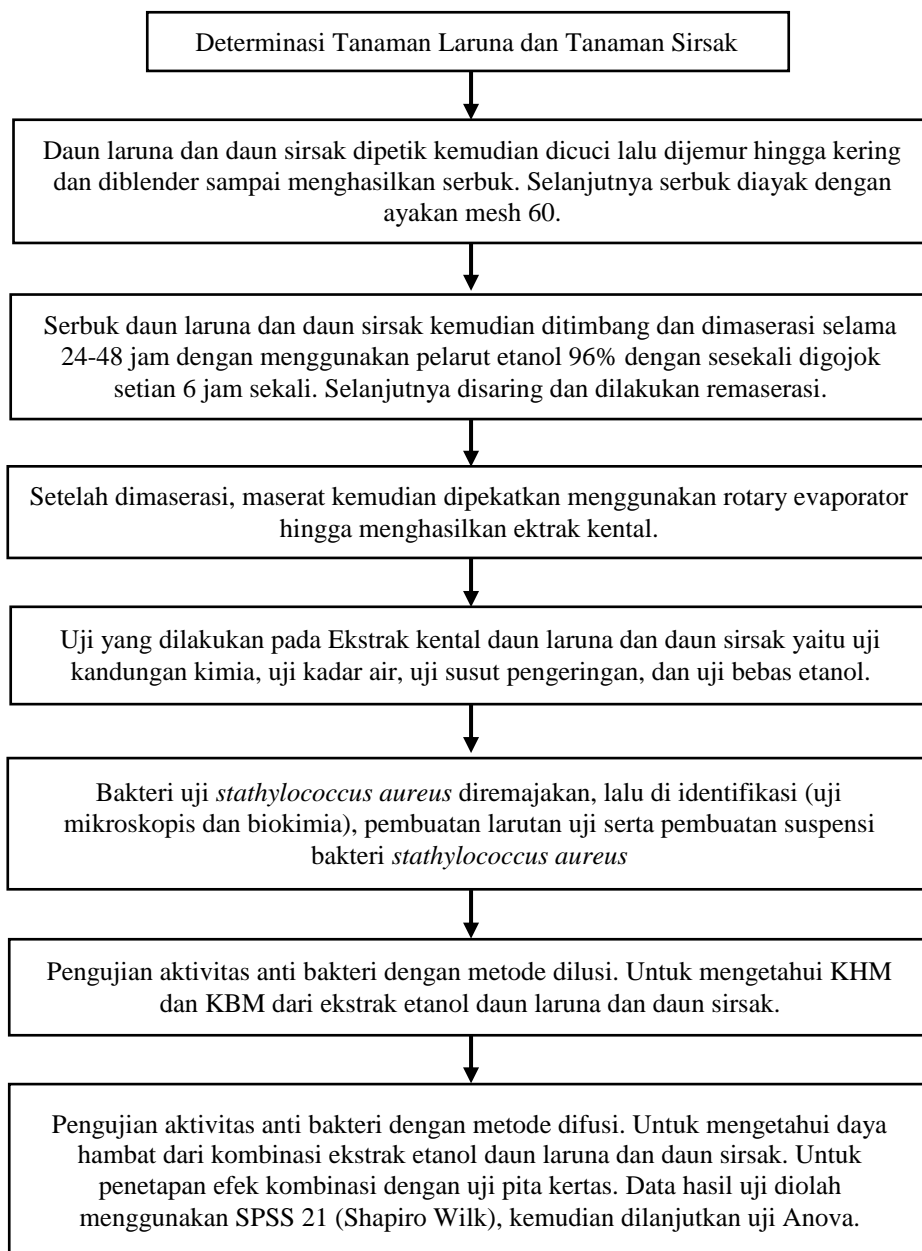
15. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Pita Kertas

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan media MHA yang telah memadat dan terkandung bakteri uji. Menyiapkan penempatan pita kertas lalu diswabkan dalam waktu 10 menit suspensi bakteri 0,5 Mc Farland kedalam media MHA. Pita kertas steril yang berukuran 0,5x3 cm (kertas whatman no 1) kemudian masing-masing ditetesi 50 μ L ekstrak etanol daun Laruna dan daun Sirsak menggunakan konsentrasi dari ekstrak kombinasi paling efektif. Uji efek kombinasi dengan menggunakan metode pita kertas. Media padat yang ada di cawan petri lalu diinokulasi bakteri pada media tersebut. Pita kertas yang sudah ditetaskan kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri di permukaan agar yang sudah diinokulasi bakteri serta posisi tegak lurus salah bagian ujung tumpang tindih pada satu titik terbentuk huruf "L". Pita kertas selanjutnya inkubasi dengan suhu ruangan selama 1 jam lalu inkubasi dengan suhu 37⁰Celcius selama 24 jam. Menghasilkan efek kombinasi yang ditentukan dari pola hambat pertumbuhan mikroba yang membentuk sekeliling pita kertas berupa daerah bening. Diulangi dengan minimal 3 kali replikasi (Bleson,2015).

E. Analisis Hasil

Hasil dari metode pengujian aktivitas antibakteri ini direpresentasikan dalam bentuk nilai zona hambat, yang diukur dalam satuan milimeter, dari perbandingan kombinasi ekstrak daun Laruna dan daun Sirsak. Data yang terhasil kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS 21 untuk memeriksa apakah data tersebut terdistribusi secara normal atau tidak, dengan mengaplikasikan uji Shapiro-Wilk. Apabila data terdistribusi normal ($p>0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji parametrik seperti ANOVA. Sementara jika data tidak terdistribusi normal, analisis dilanjutkan dengan uji non-parametrik Kruskal-Wallis. Pada tahap ini, nilai zona hambat dan zona bening juga diperoleh dari kontrol positif dan perlakuan yang diujikan pada jenis bakteri yang sama.

F. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema Penelitian