

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah seluruh objek yang memiliki karakteristik yang dapat dijadikan sebagai anggota sampel (Sugiyono, 2023). Pada penelitian ini, populasi yang digunakan adalah kulit manggis dan rimpang kunyit yang diambil dari Tawangmangu, Karanganyar pada bulan Januari 2025.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian (Sugiyono, 2023). Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah kulit manggis dan rimpang kunyit yang diambil dari Tawangmangu, Karanganyar Jawa Tengah pada bulan Februari. Kulit rimpang kunyit yang digunakan pada penelitian ini yang berwarna jingga kecoklatan, masih segar, daging rimpang berwarna merah-jingga-kekuningan, dengan rasa getir sedangkan kulit manggis yang digunakan berwarna merah, segar, keras dan tidak ada getah yang berwarna kuning kehijauan menempel

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

1.1 Variabel Bebas (*Independent*). Variabel bebas adalah variable yang dapat mempengaruhi hasil akhir (Sugiyono, 2023). Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu kombinasi dari ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dan ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.).

1.2 Variabel Terikat (*Dependent*). Variabel terikat adalah variable yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena adanya variable bebas (Sugiyono, 2023). Variabel terikat pada penelitian ini adalah terbentuknya zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

1.3 Variabel Kontrol. Variabel kontrol adalah variabel yang dapat dikontrol (Sugiyono, 2023). Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah waktu inkubasi dan pertumbuhan bakteri.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Terdapat beberapa variabel yang diklasifikasikan berdasarkan jenis dan peranannya.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit manggis dan ekstrak etanol rimpang kunyit, yang sengaja dimanipulasi untuk melihat pengaruhnya terhadap aktivitas antibakteri.

Variabel terganggu adalah aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, yang diukur melalui zona hambatan bakteri pada media agar, sebagai efek yang diamati akibat perlakuan ekstrak tanaman tersebut. Variabel moderator seperti konsentrasi ekstrak juga dapat mempengaruhi kekuatan antibakteri yang dihasilkan, meskipun bukan fokus utama dalam penelitian ini.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang mempengaruhi variabel terganggu sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang akan diperoleh tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti secara tepat. Hal yang perlu dijaga, seperti jenis bakteri yang digunakan (*S. aureus*), suhu inkubasi, waktu inkubasi, serta media tanam yang digunakan, untuk memastikan bahwa hasil penelitian tidak dipengaruhi oleh faktor-faktor eksternal. Variabel rangsang seperti kondisi lingkungan laboratorium dan variasi dalam proses ekstraksi bahan mungkin memiliki pengaruh yang tidak signifikan terhadap hasil penelitian dan dapat diabaikan dalam analisis.

Terakhir, variabel intervening seperti komponen bioaktif dalam ekstrak, seperti xanthones pada kulit manggis dan curcumin pada kunyit, berperan sebagai penjelas hubungan antara ekstrak tanaman dan aktivitas antibakteri, karena senyawa-senyawa ini dapat mempengaruhi efektivitas antibakteri yang dihasilkan. Semua variabel ini saling berinteraksi dalam penelitian untuk mengevaluasi potensi antibakteri dari kombinasi ekstrak kulit manggis dan kunyit terhadap *S. aureus*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) adalah kulit bagian dalam buah manggis yang berwarna merah hingga tua yang diambil dari Tawangmangu, Karanganyar.

Kedua, rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.) adalah rimpang yang berwarna coklat kekuningan dengan bagian dalam berwarna jingga kusam yang diambil dari Tawangmangu, Karanganyar.

Ketiga, serbuk kulit manggis dan rimpang kunyit tersebut dicuci bersih menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan debu, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C. Setelah kering, kulit dan rimpang dihaluskan menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan nomor 40.

Keempat, Ekstrak yang diperoleh dengan cara mengekstraksi serbuk kulit manggis dan rimpang kunyit menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak ini kemudian diuji untuk mengetahui efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Kelima, Aktivitas antibakteri yang diukur melalui uji difusi agar, dengan mengamati zona hambat yang terbentuk pada media agar setelah diberikan ekstrak etanol kulit manggis dan rimpang kunyit. Zona hambat ini digunakan untuk mengukur kemampuan kombinasi ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

C. Alat Dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya botol maserasi, timbangan analitik, *vaccum rotary evaporator*, cawan petri, blender, oven, inkubator, *sterilizer badwell*, *moisture balance*.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.), yang merupakan kulit bagian dalam buah manggis yang diambil dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, dan digunakan sebagai bahan utama untuk ekstraksi. Selain itu, rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.) yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, juga digunakan sebagai bahan utama untuk ekstraksi. Etanol 96%. Bahan untuk uji aktivitas antibakteri biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, media yang digunakan dalam penelitian adalah media agar nutrient, MHA (*Muller Hinton Agar*), MSA (*Mannitol Salt Agar*), larutan NaCl 0,9% (*saline solution*).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Identifikasi dilakukan dengan cara melakukan determinasi pada tanaman manggis dan kunyit. Daterminasi tumbuhan merupakan proses dalam menetapkan kebenaran sampel tanaman kulit manggis dan rimpang kunyit. Determinasi dan identifikasi dilakukan dengan ciri-ciri morfologi dari suatu tanaman. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi.

2. Pembuatan Serbuk

Kulit manggis dicuci bersih, ditiriskan, diambil bagian dalam kulit buah (mesocarp) dan dipotong kecil-kecil, dilanjutkan dengan

pengeringan dengan oven pada suhu 50°C selama kurang lebih 3 hari sampai didapatkan bobot konstan simplisia yang menandakan pengeringan telah selesai. Kulit buah manggis yang telah keringkan di-blender hingga menjadi serbuk halus dan diayak. Serbuk yang didapat disimpan dalam wadah tertutup rapat dan kering (Sueno *et al.*, 2017). Efisiensi proses pengeringan dilihat berdasarkan persentase antara bobot basah simplisia dengan bobot kering (sebelum diproses/diserbukkan).

Rimpang kunyit disortir untuk memisahkan bagian yang sesuai, kemudian dicuci dengan air mengalir agar kotoran yang menempel pada kulit manggis dan rimpang kunyit hilang. Setelah dibersihkan dapat dioven pada suhu 40°C selama 4 hari. Simplisia yang sudah dikeringkan dapat diserbuk dengan alat penyerbukan (blender). Diblender sampai halus kemudian diayak dengan pengayak mesh 40 sehingga diperoleh serbuk simplisia yang homogen dan disimpan dalam wadah tertutup rapat (Cahya dan Prabowo, 2019).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot serbuk}}{\text{bobot simplisia kering}} \times 100\%$$

3. Penetapan Susut Pengeringan Serbuk Kulit Manggis dan Rimpang Kunyit

Penetapan susut pengeringan masing-masing serbuk kulit manggis dan rimpang kunyit dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Serbuk kulit manggis dan rimpang kunyit masing-masing ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian serbuk diukur persentase susut pengeringannya pada alat *Moisture balance* dengan suhu 105°C selama 30 menit atau hingga bobot tetap yang ditandai dengan bunyi pada alat. Pengujian dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Sarosa *et al.*, 2023). Susut pengeringan dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{Bobot sebelum dikeringkan} - \text{bobot setelah dikeringkan}}{\text{Bobot sebelum dikeringkan}} \times 100\%$$

4. Penetapan Kadar Air Serbuk Kulit Manggis dan Rimpang Kunyit

Kandungan air pada serbuk kulit manggis dan rimpang kunyit menggunakan metode Azeotropi atau destilasi toluene. Pertama, kocok sejumlah toluene dengan sedikit air, biarkan memisah dan buang lapisan air. Timbang serbuk kulit manggis dan rimpang kunyit masing-masing sebanyak 200 gram dalam air 100 ml, secara perlahan-lahan tambahkan asam sulfat 1,5 L bilas dengan air, kemudian dikeringkan dalam lemari pengering timbang seksama sejumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1 sampai 4 ml air masukkan kedalam labu kering.

Masukkan ke dalam labu alas bulat, tambahkan kurang lebih 200 ml *toluene* yang sudah dijenuhkan. Pasangkan rangkaian alat, panaskan labu selama 15 menit. Atur kecepatan penyulingan kurang lebih 2 tetes per detik, hingga sebagian air tersuling kemudian kecepatan dinaikkan menjadi hingga 4 tetes per detik pemanasan berlangsung selama 5 menit. Tabung penerima didinginkan hingga air memisah sempurna, volume air dapat dibaca dan dihitung dalam % v/b (Kemenkes RI, 2017).

5. Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Manggis dan Rimpang Kunyit

5.1 Pembuatan ekstrak etanol kulit manggis. Dimasukkan 600 gram serbuk simplisia ke dalam bejana maserasi, lalu ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 6 L hingga seluruh serbuk terendam. Didiamkan campuran tersebut sambil sesekali diaduk. Diganti pelarut sebanyak 3000 ml setelah 24 jam, dan lanjutkan proses maserasi selama dua hari. Setelah itu, saring campuran untuk memisahkan larutan. Larutan ekstrak yang diperoleh diuapkan menggunakan *vaccum rotary evaporator* hingga menghasilkan ekstrak kental kulit manggis. Ekstrak kental tersebut selanjutnya diuji untuk susut pengeringan serta dilakukan skrining fitokimia.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot serbuk}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$$

5.2 Pembuatan ekstrak etanol rimpang kunyit. Dimasukkan 600 gram serbuk simplisia ke dalam bejana maserasi, lalu ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 6 L hingga seluruh serbuk terendam. Didiamkan campuran tersebut sambil sesekali diaduk. Diganti pelarut sebanyak 3000 ml setelah 24 jam, dan dilanjutkan proses maserasi selama dua hari. Setelah itu, disaring campuran untuk memisahkan larutan. Larutan ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya menggunakan *vaccum rotary evaporator* hingga menghasilkan ekstrak kental etanol rimpang kunyit. Ekstrak kental tersebut selanjutnya diuji untuk susut pengeringan serta dilakukan skrining fitokimia.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot serbuk}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$$

6. Uji Bebas Etanol

Pengujian bebas etanol dimulai dengan memasukkan 5 mL sampel ekstrak uji ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan 1 mL asam asetat glasial dan 1 mL asam sulfat pekat, diikuti dengan homogenisasi dan pemanasan di mana bagian atas tabung ditutup kapas. Ekstrak dianggap bebas etanol jika tidak tercium bau ester yang merupakan karakteristik etanol (Agustie & Samsumaharto, 2013).

7. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Etanol Kulit Manggis dan Rimpang Kunyit dengan Metode Tabung

7.1 Penyiapan sampel. Ekstrak etanol kulit manggis dan rimpang kunyit ditimbang kurang lebih 1 gram, kemudian masukkan dalam beaker glass dan dilarutkan ke dalam 100 mL etanol. Larutan ekstrak kulit manggis dan rimpang kunyit kemudian dipanaskan di atas waterbath selama 15 menit kemudian lakukan penyaringan. Hasil filtrat yang diperoleh sebagai sampel untuk pengujian identifikasi senyawa

7.2 Alkaloid. Ambil filtrat sebanyak 5 ml masukkan ke dalam tabung reaksi ditambah 1 mL HCl 2 N dan 9 mL air, panaskan selama 2 menit. Kemudian, dinginkan dan disaring, filtratnya ditambah 3 tetes pereaksi *Mayer*, *Dragendroff* dan *Bouchardat*. Alkaloid menunjukkan hasil positif jika terbentuk endapan berwarna putih kekuningan dengan pereagen *Mayer*, akan terbentuk warna kecoklatan atau merah bata dengan pereagen *Dragendroff* dan endapan berwarna merah jingga, dengan pereagen *Bouchardat* akan menghasilkan endapan coklat (Pramiastuti dan Joharoh, 2020).

7.3 Flavonoid. Ambil filtrat sebanyak 5 ml masukkan ke dalam tabung reaksi tambahkan 10 ml akuades dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan pita Mg, 1 ml HCl pekat dan 1 ml amilalkohol kemudian dikocok dengan kuat. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning (Da Gama, 2021).

7.4 Saponin. Sejumlah sampel dimasukkan pada tabung reaksi tambahkan 10 ml akuades panas, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk busa yang stabil (Ikhwanudin *et al.*, 2022).

7.5 Tanin. Ambil filtrat sebanyak 5 ml masukkan ke dalam tabung reaksi ditambah akuades 10 ml, kemudian dipanaskan lalu disaring. Filtrat ditambah 3 tetes FeCl_3 1% dan diamati warna yang terbentuk. Hasil positif terbentuk warna biru dan hijau kehitaman (Ikhwanudin *et al.*, 2022).

7.6 Steroid. Ambil filtrat sebanyak 5 ml masukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 3 tetes pereaksi Lieberman Bourchard. Terbentuk warna merah sampai ungu positif triterpenoid dan warna hijau sampai biru, menunjukkan positif steroid (Fransiska *et al.*, 2021).

8. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Etanol Kulit Manggis dan Rimpang Kunyit dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis

Metode ini digunakan karena keterbatasan senyawa murni sebagai pembanding untuk penegasan adanya senyawa metabolit sekunder pada masing-masing simplisia. Identifikasi kualitatif ekstrak kulit manggis dideteksi menggunakan spektrofotometri UV-Vis, di mana metode ini dapat mengidentifikasi struktur senyawa berdasarkan panjang gelombang maksimal senyawa metabolit sekunder tersebut (Rasyid *et al.*, 2015).

Hasil pemeriksaan spektra diperoleh dari pembuatan larutan senyawa mangosteen dengan methanol, kemudian dianalisis serapan maksimal pada panjang gelombang 200-400nm (Kautsari *et al.*, 2021). Hasil pemeriksaan spektra ekstrak rimpang kunyit dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol pada panjang gelombang 200-600nm dengan spektrofotometri visible (Elizarni & Yanti, 2019; Vikri *et al.*, 2022).

8.1 Pengujian spektrum ekstrak kulit manggis. Ekstrak etanol dari kulit manggis ditimbang seksama 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 100ml methanol dalam labu takar, hingga diperoleh konsentrasi larutan induk sebesar 100ppm. Dipipet 1ml dari larutan induk 100ppm, dimasukkan dalam labu takar 10ml, lalu ditambahkan methanol sampai batas tanda labu ukur. Kemudian digojok untuk dihomogenkan, lalu dibaca serapannya menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 200-400nm, dan ditentukan panjang gelombang maksimalnya pada absorbansi paling besar (Rasyid *et al.*, 2015).

8.2 Pengujian spectrum ekstrak rimpang kunyit. Ekstrak rimpang kunyit ditimbang seksama 20mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml lalu ditambahkan 15 ml etanol. Dimasukkan dalam ultrasonic selama 10 menit, kemudian ditambahkan etanol hingga batas tanda di labu ukur, lalu dikocok dan dihomogenkan. Kemudian dilanjutkan dengan disaring, lalu filtrat hasil saringan dipipet 1ml dimasukkan dalam labu ukur 50ml, lalu ditambahkan etanol sampai tanda. Setelah dikocok dan homogeny, dibaca serapannya di spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 200-600nm (Elizarni & Yanti, 2019).

8.3 Hasil yang Diharapkan. Pembacaan spektra yang diperoleh dari pengukuran panjang gelombang maksimalakan diperoleh puncak-

puncak yang spesifik di mana memberikan visualisasi senyawa aktif utama dari masing-masing ekstrak (Setyawati *et al.*, 2019; Vikri *et al.*, 2022). Identifikasi α -mangostin dan kurkuminoid membantu memvalidasi keberadaan senyawa aktif yang berkontribusi pada aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Korelasi antara kandungan senyawa aktif dengan hasil uji antibakteri dapat dilakukan untuk mendukung efektivitas kombinasi ekstrak. Metode ini penting untuk mengonfirmasi bahwa senyawa bioaktif utama terdapat dalam ekstrak, sehingga hasil uji antibakteri dapat dihubungkan langsung dengan keberadaan senyawa tersebut.

9. Proses Sterilisasi

Semua peralatan yang akan disterilisasi lebih baik agar disegel terlebih dahulu menggunakan aluminium foil, disarankan agar tidak menggunakan kertas apabila suhu sterilisasi lebih dari 170°C selama 30 menit dikarenakan kertas akan terurai pada suhu tersebut. Media yang akan digunakan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Aditya dan Myori, 2020)

10. Peremajaan Bakteri

Satu koloni biakan murni bakteri *S. aureus* diambil menggunakan ose steril dari kultur murninya, selanjutnya diinokulasikan dalam medium Nutrien Agar miring dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Martsiningsih *et al.*, 2023).

11. Pembuatan Larutan Mc Farland

Larutan H₂SO₄ 0,36 N sebanyak 99,5 ml dicampurkan dengan larutan BaCl₂.2H₂O 1,175% sebanyak 0,5 ml dalam erlenmeyer. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Dima, L. R. 2016).

12. Pembuatan Media Uji MHA (*Muller Hinton Agar*)

Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 3,8 gram dimasukkan ke dalam erlenmayer 100 mL dilarutkan dengan aquadest steril 100 mL, media ditutup dengan aluminium foil dan dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dituang ke dalam petridish steril setelah 15 menit dan dikerjakan dalam LAF kemudian media ditunggu hingga memadat dan ditutup, dibungkus kertas dan simpan dalam kulkas (Janna dan Maryati, 2023).

13. Identifikasi Bakteri Uji

Identifikasi bakteri uji menggunakan pewarna Gram, uji koagulase, uji katalase, dan uji media selektif.

13.1 Pewarnaan Gram. Bakteri diambil 1 ose digores tipis pada preparat dan difiksasi diatas api kemudian ditetaskan pewarna Gram A dibiarkan 1 menit, dibilas dengan air mengalir, ditetaskan Gram B dibiarkan 1 menit, dicuci dengan Gram C dan dikeringkan, kemudian ditetaskan pewarna Gram D sebagai cat lawan atau penutup dibiarkan 1 menit, dibilas kembali dengan air lalu dikeringkan, hasil diamati dibawah mikroskop. Bakteri Gram positif akan mempertahankan zat warna kristal violet sehingga akan berwarna ungu. Hasil positif ditunjukkan dengan koloni bentuk bulat bergerombol seperti anggur dan berwarna ungu saat diamati dibawah mikroskop (Marbun, 2020).

13.2 Uji katalase. Uji katalase dilakukan dengan meneteskan 2 tetes hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% pada gelas objek yang bersih, kemudian biakan bakteri uji diambil dengan ose dan dioleskan pada gelas objek. Hasil positif pada genus *Staphylococcus* ditandai dengan terbentuknya gelembung gas.

13.3 Uji koagulase. Uji Koagulase dilakukan dengan menambahkan plasma ke dalam tabung yang berisi bakteri, lalu diamati terjadinya gumpalan. Metode yang digunakan pada identifikasi ini dengan metode tabung. Pertama, bakteri diisolasi menggunakan ose, lalu dimasukkan dalam tabung yang berisi *nutrient broth*, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu $37^{\circ}C$. setelah itu dimasukkan plasma pada tabung yang berisi bakteri dnegan spuit, diinkubasi selama 4 jam, diamati terjadinya gumpalan seperti gel pada (Marbun, 2020).

13.4 Uji media selektif *Vogel Jhonson Agar*. Uji media selektif dalam penelitian ini dilakukan untuk memastikan bahwa media yang digunakan, yaitu VJA, dapat mendukung pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan mendeteksi aktivitas antibakteri dari ekstrak yang diuji. Prosedur dimulai dengan menyiapkan media agar nutrien yang telah disterilisasi menggunakan autoclave, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Setelah itu, inokulasi bakteri *S. aureus* dilakukan dengan cara menyebarkan bakteri ke permukaan media agar menggunakan swab steril. Identifikasi ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan *S. aureus* dalam memfermentasikan mannitol. Biarkan *S. aureus* diinokulasikan secara gores pada media VJA dalam cawan petri dan diinokulasikan pada suhu $37^{\circ}C$ selama 24 jam. Hasil

positif *S. aureus* ditandai dengan koloni yang dihasilkan berwarna putih serta perubahan warna media dari warna merah menjadi kuning (Niswah *et al.*, 2023).

14. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji *Staphylococcus aureus*

Membuat larutan suspensi bakteri *S. aureus* diambil 1 ose bakteri, dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologi 0,9%, dengan biakan murni *S. aureus* didalam tabung reaksi dikocok-kocok sampai homogen. Kemudian disamakan dengan standar Mc Farland.

15. Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak kental kulit manggis dan rimpang kunyit dibuat larutan konsentrasi 20% dalam 5 mL. Masing-masing larutan konsentrasi tersebut dibuat larutan kombinasi dengan perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1 dengan volume (Listina *et al.*, 2023).

16. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Dilusi

Ekstrak tunggal kulit manggis dan rimpang kunyit diuji aktivitas antibakterinya dengan metode dilusi untuk mengetahui KHM dan KBM dari masing-masing ekstrak. Uji ini menggunakan 10 tabung reaksi yang telah disterilkan. Seri konsentrasi pengenceran dari masing-masing ekstrak yang digunakan adalah 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; dan 0,39%. Tabung ke 3 sampai 9 ditambahkan 0,5 ml media BHI. Tabung kedua ditambahkan 0,5 ml sampel, kemudian dari tabung kedua diambil 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung ketiga, dan dari tabung ketiga diambil 0,5 ml untuk dimasukkan ke dalam tabung keempat begitu seterusnya sampai tabung kesembilan, sedangkan pada tabung kesembilan diambil 0,5 ml dan dibuang. Suspensi bakteri dipipet sebanyak 0,5 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi 2 sampai 9 dan dihomogenkan.

Tabung pertama sebagai kontrol negatif (DMSO 10%) diisi 0,5 ml sampel dan tabung ke sepuluh diisi 0,5 ml suspensi bakteri yang digunakan sebagai kontrol positif. Seluruh tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diamati hambatan pertumbuhan bakteri dengan membandingkan kekeruhan tiap tabung dengan kontrol positif (ciprofloksasin). Seri konsentrasi pengenceran dari masing-masing ekstrak pada konsentrasi terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri ditetapkan sebagai nilai KHM. Konsentrasi yang ditetapkan sebagai KHM dikultur ulang pada media selektif VJA tanpa penambahan mikroba uji maupun zat antibakteri dengan cara

digoreskan menggunakan jarum ose pada media VJA yang telah memadat, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada media VJA jika tidak terdapat koloni bakteri setelah diinkubasi ditetapkan sebagai nilai KBM. Pengujian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Niswah *et al.*,2023).

17. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap ekstrak etanol kulit manggis dan rimpang kunyit secara kombinasi. Kontrol positif yang digunakan yaitu antibiotik ciprofloksasin dan kontrol negatif yang digunakan yaitu larutan DMSO 10%. Metode yang digunakan yaitu metode difusi dengan kertas cakram (*paper disk*). Suspensi bakteri terstandar *Mc Farland* 0,5 diambil menggunakan kapas lidi steril sebanyak satu kali dioleskan pada cawan petri yang berisi media MHA (Mueller Hinton Agar) dan diamankan sekitar 5 menit atau hingga memadat pada suhu ruang.

Konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk uji difusi yaitu hasil konsentrasi bunuh minimal (KBM) pada masing-masing ekstrak kulit manggis dan rimpang kunyit dengan metode dilusi. Masing-masing konsentrasi kemudian dikombinasi dan dibuat variasi konsentrasi dengan perbandingan 1:1; 1:2 dan 2:1. Media MHA yang telah memadat di bagian permukaannya diletakkan kertas cakram dan ditetesi menggunakan mikropipette sebanyak 20 µL larutan ekstrak. Cakram diletakkan pada permukaan media MHA dengan pinset, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi diamati zona hambat yang terbentuk disekeliling kertas cakram dan diukur diameternya. Pengujian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Daerah bening menunjukkan kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lainnya yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong dengan mengukur diameter secara keseluruhan dari 3 sisi yang berbeda, kemudian hasil akhir merupakan hasil rata-rata dari pengukuran ketiga sisi tersebut. Selanjutnya diameter zona hambat dikategorikan sesuai dengan kriteria kekuatan daya antibakteri. Jika semakin luas zona bening maka semakin besar suatu bahan dalam menghambat pertumbuhan bakteri (Niswah *et al.*,2023).

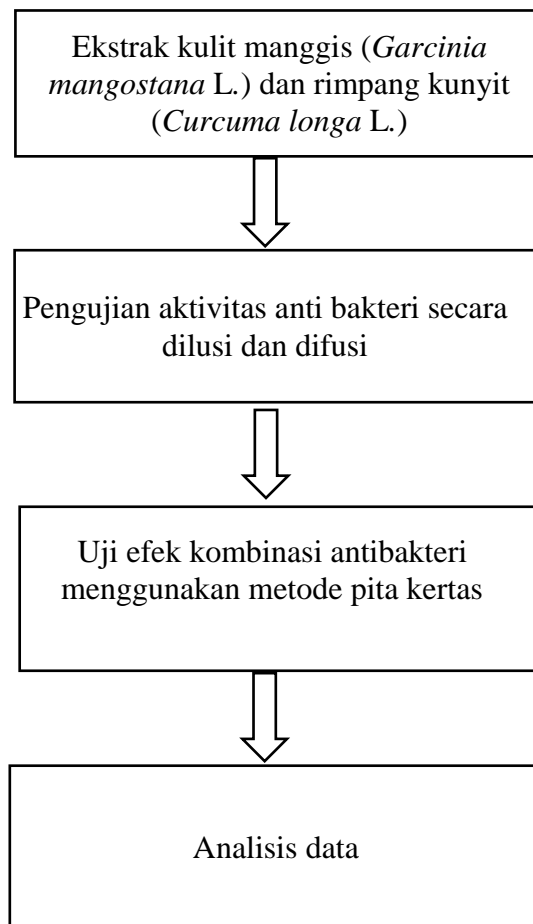
18. Uji Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Pita Kertas

Penentuan pola efek kombinasi ekstrak etanol kulit manggis dan rimpang kunyit dilakukan menggunakan metode pita kertas. Sebanyak 30 μ L ekstrak uji dengan konsentrasi 20% b/v diteteskan pada pita kertas berukuran 3 cm x 0,5 cm, kemudian pita diletakkan membentuk sudut 90° di atas media agar NA yang diinokulasi bakteri. Setelah diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, pola efek diamati berdasarkan zona bening di sudut 90° untuk menentukan efek synergistic (peningkatan zona hambat), antagonist (penurunan zona hambat), atau additive/indifferent (tidak ada perubahan zona). Uji dilakukan secara duplo sesuai metode (Listina *et al.*, 2023).

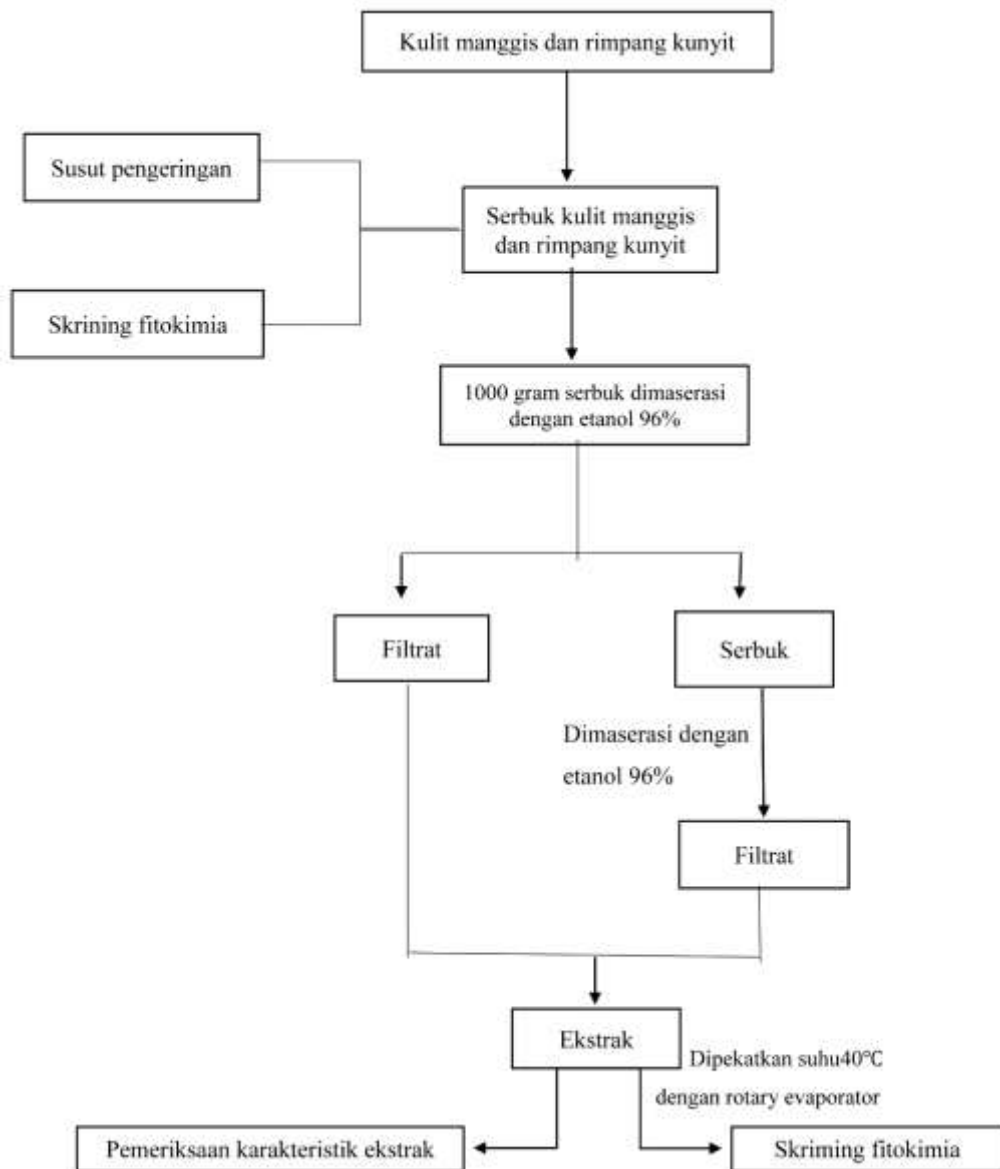
E. Analisis Hasil

Aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dan ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.) dapat diketahui dengan cara menghitung diameter daya hambat. Analisis data yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dan ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah menggunakan uji statistik *One Way Anova* (*Analysis of Variance*) dengan $\text{sig} < 0.05$. Sebelum dianalisis dengan menggunakan metode *One Way Anova* dilakukan uji normalitas terlebih dahulu. Uji normalitas yang digunakan adalah *Shapiro-wilk*. Uji normalitas berfungsi untuk mengetahui data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Apabila $\text{sig} > 0.05$ maka data berdistribusi normal. Uji *One Way Anova* dapat dilakukan jika pada uji normalitas dan uji homogenitas memiliki nilai hitung yang signifikan. Pada pengujian *One Way Anova* dapat dikatakan memiliki perbedaan yang nyata apabila nilai $\text{sig} < 0.05$.

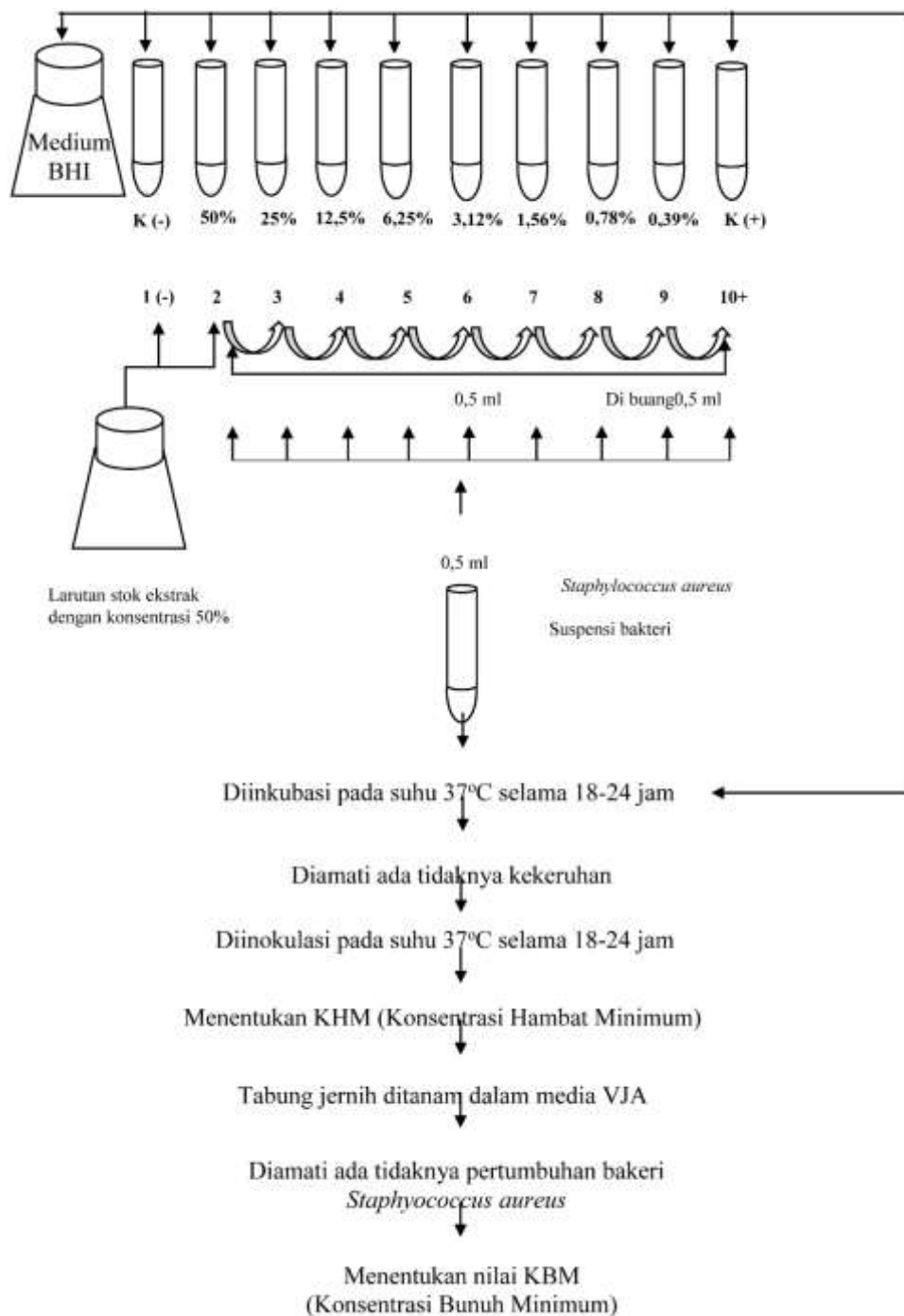
F. Skema Penelitian



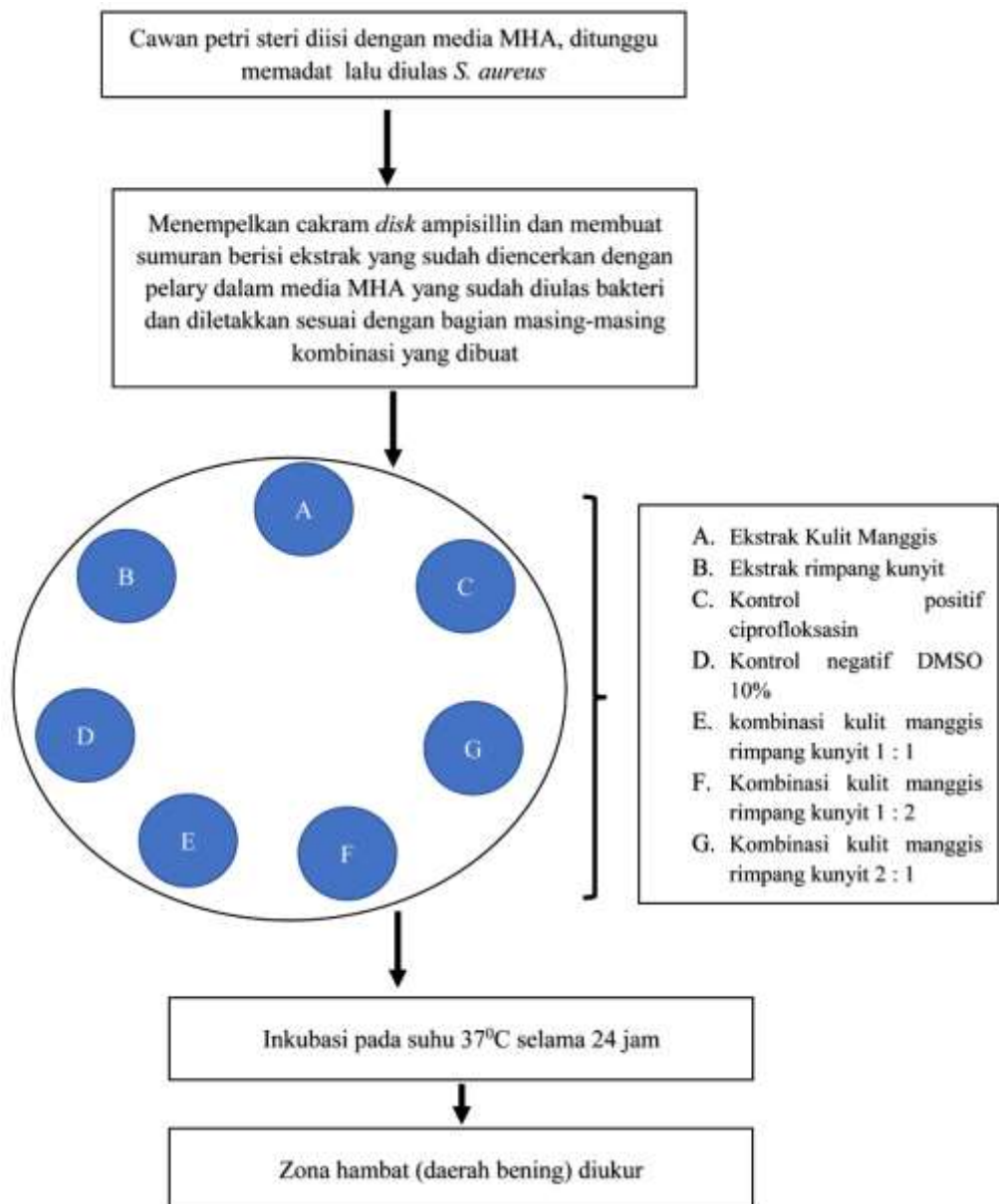
Gambar 11. Skema Jalannya Penelitian



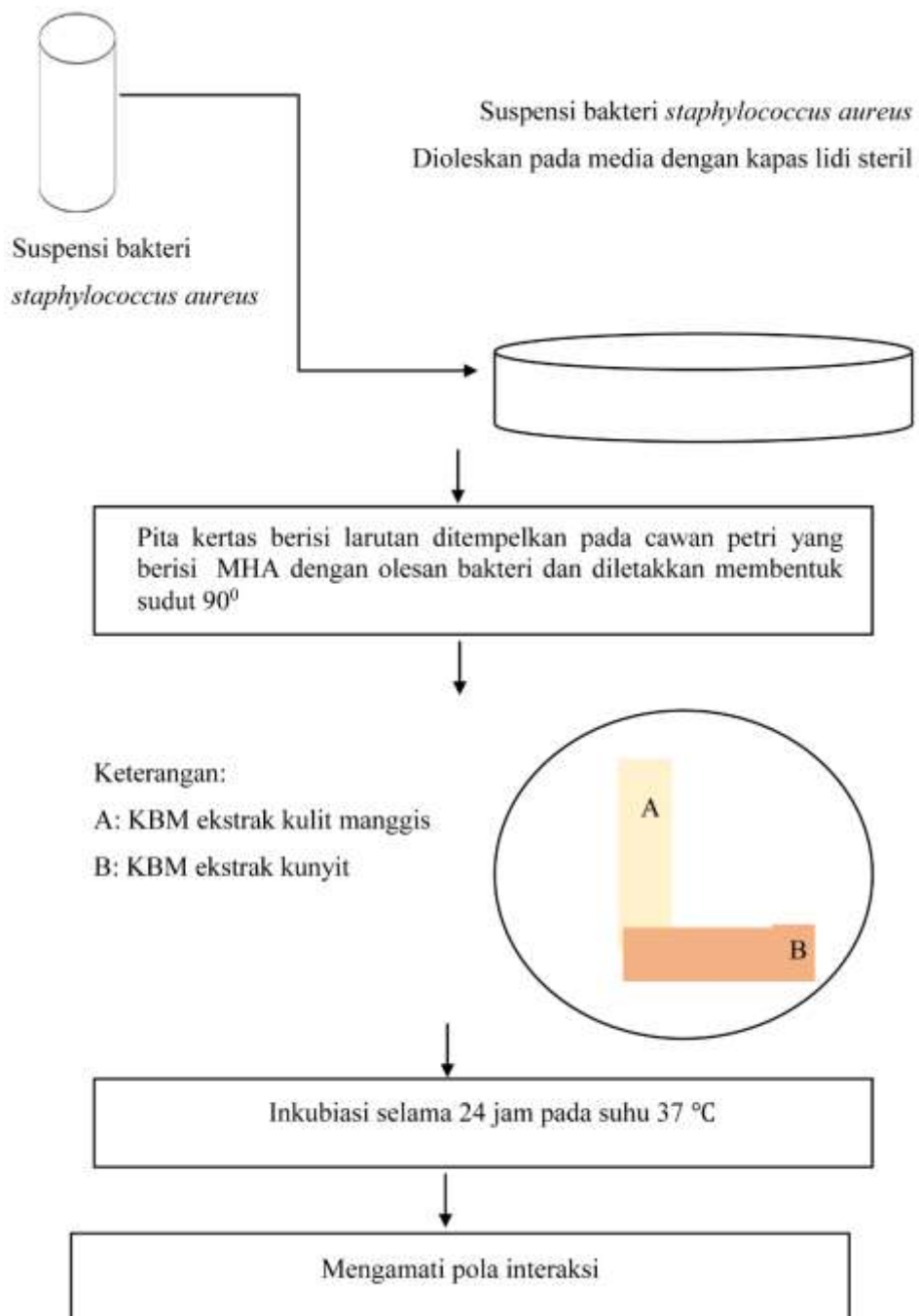
Gambar 12. Alur Ekstraksi Kulit Manggis Dan Rimpang Kunyit



Gambar 13. Skema Pengujian Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Kulit Manggis Dan Rimpang Kunyit Dengan Metode Dilusi



Gambar 14. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi



Gambar 15. Skema Pengujian Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Kulit Manggis Dan Rimpang Kunyit Dengan Metode Pita Kerta