

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah objek yang menjadi sasaran dalam suatu penelitian. Populasi tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) diperoleh dari daerah Surakarta, Jawa Tengah dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Agustus 2023.

Sampel adalah bagian dari populasi yang dipergunakan untuk kepentingan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi segar dengan ciri-ciri warna hijau tua hingga muda, bebas dari penyakit, bebas hama, dipilih secara acak dengan tulang daun menyirip dan berbulu. Sampel daun sirsak berupa daun berwarna hijau pekat, segar, bebas dari hama, tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dipetik pada lembar ke 4-6 dari pucuk.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama ekstrak etanol 96% daun kemangi dan daun sirsak.

Variabel utama yang kedua, nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) ekstrak daun kemangi dan ekstrak daun sirsak terhadap bakteri *S. aureus*.

Variabel utama yang ketiga, aktivitas kombinasi ekstrak dengan perbandingan (1:1); (1:2); (2:1) ekstrak etanol daun kemangi dan ekstrak etanol daun sirsak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*.

Variabel utama yang keempat, pola kombinasi ekstrak etanol daun kemangi dan ekstrak daun sirsak terhadap bakteri *S. aureus*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel dapat diklasifikasikan menjadi tiga yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk menguji pengaruh perbedaannya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi dan kombinasi ekstrak etanol 96% daun kemangi dan ekstrak daun sirsak dengan metode maserasi.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang menjadi kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dari dalam penelitian ini yaitu aktivitas kombinasi ekstrak etanol daun kemangi dan ekstrak etanol daun sirsak yang dapat mempengaruhi konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dari *S. aureus* pada media uji.

Variabel kendali merupakan suatu variabel yang mampu mempengaruhi variabel tergantung serta perlu penetapan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar kemudian dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali pada penelitian ini yaitu kemurnian bakteri *S. aureus*, media, metode ekstraksi, kondisi laboratorium, sterilisasi.

3. Definisi oprasional variabel utama

Pertama, daun kemangi adalah daun daun segar yang diambil saat waktu panen dengan warna hijau tua hingga hijau muda, tulang daun menyirip, berbulu, dan diambil dari Kota Surakarta, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun kemangi adalah serbuk yang didapat dari daun kemangi kering yang dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam, lalu dihancurkan dan diayak menggunakan mesh 40.

Ketiga, ekstrak tunggal daun kemangi adalah pemisahan senyawa fitokimia dari serbuk daun kemangi menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi.

Keempat, daun sirsak adalah daun segar, berwarna hijau pekat, dipetik pada lembar ke 4-6 dari pucuk, dan tidak terlalu tua dan terlalu muda yang diperoleh secara acak dari desa Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kelima, serbuk daun sirsak adalah serbuk yang diperoleh dari daun sirsak kering yang dikeringkan dengan sinar matahari yang ditutupi dengan kain hitam, kemudian dihaluskan dan diayak menggunakan mesh 40.

Keenam, ekstrak tunggal daun sirsak yaitu pemisahan senyawa dari serbuk daun sirsak menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi.

Ketujuh, bakteri *S. aureus* ATTC 25923 adalah bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi di Surakarta.

Kedelapan, perbandingan kombinasi (1:1) adalah 1 KBM ekstrak daun kemangi : 1 KBM ekstrak daun sirsak.

Kesembilan, perbandingan kombinasi (1:2) adalah 1 KBM ekstrak daun kemangi : 2 KBM ekstrak daun sirsak.

Kesepuluh, perbandingan kombinasi (2:1) adalah 2 KBM ekstrak daun kemangi : 1 KBM ekstrak daun sirsak.

Kesebelas, dilusi adalah metode yang digunakan untuk menentukan nilai KBM, pada konsentrasi bunuh minimum bakteri *S. aureus* dilakukan pada masing-masing sampel uji daun kemangi, daun sirsak, dan kombinasi ekstrak daun kemangi dan daun sirsak.

Keduabelas, metode difusi adalah metode yang digunakan untuk mengetahui diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri dari kombinasi ekstrak daun kemangi dan daun sirsak.

Ketigabelas, kombinasi metode difusi pita kertas adalah menentukan pola kombinasi dengan kertas *whatman* membentuk sudut 90°C berdasarkan zona hambat yang terbentuk. Hasil dapat berupa pola sinergis, antagonis, atau adiktif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analisa, alat penggiling, ayakan mesh 40, maserator, erlenmeyer, mikropipet, kertas saring, cawan porselain, gelas ukur, batang pengaduk, desikator, kertas cakram, spiritus, jangka sorong, tabung reaksi, cawan petri, inkubator, *autoclaf*, LAF, ose, kaca preparat, mikroskop, rak tabung, gelas kimia, kertas *whatman*, vortex, lap, tissue, rotary evaporator, korek api, *moisture balance*, seperangkat alat destilasi, plat silica GF 254, *water bath*, dan kapas.

2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini yaitu daun kemangi dan daun sirsak yang didapatkan dari Kota Surakarta, Jawa Tengah. Medium yang digunakan *Brain Heart Infusion* (BHI), *Vogel Jhonson Agar* (VJA), MHA, dan plasma sitrat, tolluen. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus*. Bahan kimia yang digunakan meliputi etanol 96%, pereksi besi klorida, larutan *Dragendroff*, larutan sitroborat, pereaksi anisaldehyd, aquades, kalium tellurite, cat violet, lugol, iodin, dan safranin. Kloramfenikol diks sebagai kontrol positif, DMSO sebagai kontrol negatif.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi daun kemangi dan ekstrak daun sirsak. Tahapan utama dalam penelitian ini dilakukan dengan menunjukan kecocokan morfologi, ciri-ciri, serta menetapkan kebenaran sampel daun kemangi dan daun sirsak. determinasi tanaman ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional.

2. Pengambilan bahan atau sampel

Daun kemangi yang diperoleh dari daerah Surakarta, Jawa Tengah pada bulan Agustus 2023. Daun sirsak berasal dari desa Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun kemangi diambil yang berwarna hijau tua hingga muda, bebas dari penyakit, bebas hama dan daun sirsak yang diambil daun berwarna hijau segar, tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua.

3. Pembuatan serbuk

Daun kemangi dan daun sirsak dikeringkan secara terpisah menggunakan sinar matahari. Simplisia yang sudah kering diserbukkan dengan cara digiling atau dihancurkan lalu diayak menggunakan mesh no 40 hingga menjadi serbuk daun kemangi dan daun sirsak dan ditimbang. Hasil serbukan daun kemangi dan daun sirsak kemudian disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat supaya tidak terkontaminasi cemaran. Penyerbukan dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan luas permukaan kontak partikel antara sampel dan pelarut selama proses ekstraksi (Andriani *et al.*, 2016).

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun kemangi dan daun sirsak

Penetapan susut pengeringan daun kemangi dan daun sirsak dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Serbuk ditimbang sebanyak 2 g diletakkan diatas wadah alumunium lalu diratakan. Atur suhu alat *moisture balance* yang digunakan yaitu 105 °C selama 30 menit sampai mendapatkan berat konstan (Hartesi *et al.*, 2021).

5. Pembuatan ekstrak etanol

Serbuk daun kemangi ditimbang sebanyak 700 g dimasukan dalam botol maserator berwarna coklat lalu dibasahi dengan etanol 96% sebanyak 7 liter atau sama dengan perbandingan 1:10. Campuran tersebut lalu dilakukan pengadukan dan didiamkan selama 6 jam pertama dengan sesekali diaduk, lalu didiamkan selama 18 jam. Hasil

tersebut kemudian disaring dan diulangi dengan pelarut yang sama sebanyak $\frac{1}{2}$ atau 3,5 liter. Hasil filtrat disatukan lalu dibebaskan etanol dengan cara diuapkan pada *evaporator* (Handayani dan Andari, 2023).

Serbuk daun sirsak ditimbang 700 g dan dimasukkan dalam botol maserator dengan etanol 96% sebanyak 7 liter. Campuran tersebut didiamkan selama 6 jam pertama dengan sesekali pengadukan kemudian didiamkan kembali selama 18 jam. Hasil filtrat pada proses tersebut digabungkan kemudian dipekatkan dengan alat *evaporator*.

6. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk membebaskan ekstrak dari etanol sehingga diperoleh ekstrak murni tanpa adanya kontaminasi. Etanol memiliki sifat antibakteri dan antijamur. Langkah untuk melakukan uji ini dengan mengambil 1 ml ekstrak dan ditambahkan 1 ml asam asetat (CH_3COOH), lalu 1 ml asam sulfat (H_2SO_4) pekat dan kemudian dipanaskan. Parameter bebas etanol ditetapkan jika tidak adanya bau khas ester (Antarini *et al.*, 2021).

7. Penetapan kadar air ekstrak etanol daun kemangi dan daun sirsak

Penetapan kadar air ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode gravimetri. Langkah pertama cawan ditara dan timbang sampel kurang lebih 2 g. Cawan dipanaskan pada suhu 105°C selama 5 jam. Dinginkan cawan yang berisi sampel dalam desikator lalu ditimbang. Lakukan pengeringan dan timbang dengan selang waktu 1 jam sampai perbedaan penimbangan 0,25% atau 0,0005 g (FHI, 2017).

8. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun kemangi dan daun sirsak

8.1. Identifikasi tanin. Ekstrak 0,5 g ditambahkan FeCl_3 1 %, adanya tanin ditandai terbentuknya warna hijau kehitaman, dan hijau kebiruan (Atmoko, 2014).

8.2. Identifikasi alkaloid. Ekstrak 0,5 g ekstrak lalu ditambahkan 0,5 ml HCL 2% dan ditetesi dengan penguji *Dragendroff* sebanyak 3 tetes. Hasil ditandai adanya endapan jingga, merah, merah bata (Indraswari, 2016).

8.3. Identifikasi flavonoid. Ekstrak 0,5 g di larutkan dengan pelarut lalu ditambahkan 2-3 tetes asam klorida pekat (HCL) dan serbuk magnesium (Mg) dikocok kuat. Positif mengandung golongan flavonoid apabila terbentuk warna warna merah hingga jingga.

8.4. Identifikasi saponin. Ekstrak 0,5 g ditambah 10 ml aquades, menambahkan 1 tetes larutan asam klorida (HCL) 2 N dikocok kuat. Hasil positif ditandai adanya buih pada larutan.

9. Identifikasi golongan senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi fitokimia dilakukan dengan maksud untuk mengetahui kebenaran kandungan kimia pada daun kemangi dan daun sirsak. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan metode KLT yang dilakukan terhadap senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin. Ekstrak daun kemangi dan daun sirsak dilarutkan dengan pelarut yang sesuai dan digojok kemudian ditotolkan pada plat kromatografi. Plat kromatografi dimasukkan dalam bejana yang telah dijenuhkan oleh fase gerak dengan titik akhir kertas saring yang terbasahi. Elusi hingga tanda batas lalu keringkan. Noda dideteksi menggunakan sinar UV 254 nm dan 366 nm serta dengan pereaksi tertentu. Noda yang muncul kemudian dihitung nilai Rf (Cahyaningsih *et al.*, 2017).

9.1 Identifikasi tanin. Identifikasi kandungan senyawa kimia menggunakan metode KLT dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak dengan Metanol:air (6:4). Baku pembanding asam galat dan noda dideteksi dengan pereaksi FeCl_3 5%. Diamati pada sinar 366 nm berwarna hitam (Cahyaningsih *et al.*, 2017).

9.2 Identifikasi alkaloid. Identifikasi kandungan senyawa kimia menggunakan metode KLT dengan fase diam lempeng silika gel GF 254 dan fase gerak toluen: etil asetat: dietil amin dengan perbandingan (7:2:1). Baku pembanding adalah piperin dan dideteksi pada sinar UV 254 nm dan 366 nm serta disemprot dengan pereaksi *Dragendorff* bercak noda akan berwarna coklat atau coklat orange (Wullur *et al.*, 2012).

9.3 Identifikasi flavonoid. Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan dengan menggunakan metode KLT dengan fase diam plat kromatografi yaitu lempeng silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform: metanol pada perbandingan (5:5). Baku pembanding adalah quersetin dan noda bercak dideteksi dengan pereaksi semprot sitroborat (campuran asam borat dan asam sitrat dalam etanol). Hasil positif flavonoid akan berfluoresensi pada UV 366 dengan warna kuning, ungu, dan biru.

9.4 Identifikasi saponin. Identifikasi senyawa dengan metode KLT menggunakan fase diam lempeng silika gel GF 254 dan fase gerak

menggunakan campuran kloroform: metanol pada perbandingan (9:1). Baku pembanding adalah sapogenin dan pereaksi semprot yang digunakan yaitu anisaldehyd dengan terbentuknya warna pada bercak dengan warna biru atau biru violet, atau bisa juga merah, kuning, hijau, ungu, kuning kecoklatan pada sinar tampak.

9.5 Identifikasi minyak atsiri. Identifikasi senyawa daun kemangi dengan metode KLT menggunakan fase diam lempeng silika gel GF 254 dan fase gerak menggunakan heksana : etil asetat pada perbandingan (7:3). Baku pembanding adalah eugenol dan pereaksi semprot yang digunakan adalah anisaldehyd dengan warna biru violet.

10. Peremajaan bakteri uji

Bakteri uji yang tumbuh pada media cawan diambil dengan jarum ose dan inokulasi pada tabung yang berisi media *Nutrient Agar* (NA) dengan teknik streak plate. Pekerjaan ini dilakukan secara aseptis dengan api bunsen, lalu tabung berisi media tersebut dibungkus dengan kertas lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

11. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Pembuatan bakteri uji diambil dari biakan murni sekitar 2 ose dan masukan dalam tabung yang berisi media BHI, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi selanjutnya diambil 100-200 μL dimasukkan kedalam tabung yang berisi 1 ml BHI dan diinkubasi kembali selama 3-5 jam pada suhu 37°C. Suspensi yang diperoleh selanjutnya diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai didapatkan kekeruhan yang sesuai standar *Mc. Farland* $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, untuk metode difusi (CLSI, 2004). Suspensi diencerkan 1:1000 untuk pengujian dilusi (CLSI, 2002).

12. Identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus*

12.1. Identifikasi secara makroskopis. Identifikasi bakteri *S. aureus*, dalam media *Vogel Johnson Agar* (VJA) biakan bakteri diinokulasi dengan menambahkan kalium tellurite 3% sebanyak 3 tetes dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif pada bakteri uji ditandai dengan adanya warna hitam pada koloni dengan permukaan cembung, dan warna medium disekitar koloni berwarna kuning (Agustin *et al.*, 2018).

12.2. Identifikasi mikroskopis secara pewarnaan Gram. Identifikasi mikroskopis bakteri *S. aureus* dilakukan dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordant), Gram C (etanol:aseton =

peluntur), Gram D (safranin sebagai zat penutup). Objek glass dibersihkan dan difiksasi diatas api dan ulaskan suspensi bakteri, tunggu hingga kering atau fiksasi diatas api kemudian tetesi dengan Gram A sampai terwarnai lalu tunggu 1 menit, kemudian cuci dengan air mengalir. Tuangkan pewarna Gram B lalu biarkan selama 1 menit, lalu cuci objek glas dengan air mengalir. Preparat dilunturkan dengan Gram C tunggu kurang lebih selama 30 menit, dicuci dengan air mengalir dan keringkan. Tuangkan pewarna Gram D dan biarkan selama 2 menit lalu bilas dengan air pengalir dan keringkan preparat dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x10 kali menggunakan minyak emersi. Hasil positif bakteri *S. aureus* ditunjukan warna ungu, bergerombol seperti buah anggur (Khaerunnisa *et al.*, 2019).

12.3. Identifikasi biokimia. Identifikasi secara biokimia menggunakan dua cara yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase dengan suspensi bakteri uji yang ditanaman pada media nutrien cair dan ditambah 2 tetes hidrogen piroksida (H_2O_2) 3%. Enzim katalase akan menguraikan H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Hasil positif ditunjukan dengan adanya gelembung udara pada sekitar koloni, hal tersebut terjadi karena bakteri *S. aureus* memiliki enzim katalase. Uji koagulase menggunakan plasma darah kelinci ditambahkan sitrat dan biakan bakteri 1 ose. Lakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya gumpalan (Agustin *et al.*, 2018).

13. Pembuatan larutan uji

Langkah yang dilakukan untuk membuat larutan uji dilusi ekstrak etanol 96% daun kemangi dan ekstrak etanol 96% daun sirsak dengan menimbang 5 g sampel masing-masing ekstrak daun kemangi dan daun sirsak kemudian dilarutkan dengan DMSO 10% hingga 10 ml, hasil yang didapatkan larutan stok 50%.

14. Pengujian antibakteri secara dilusi

Pengujian secara dilusi digunakan untuk menentukan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dan konsentrasi hambat minimum (KHM) pada sediaan ekstrak. Pengujian ini menggunakan satu deret tabung reaksi yang berisi 12 tabung. 10 tabung digunakan untuk penelitian percobaan dan 2 tabung digunakan sebagai kontrol. Metode ini menggunakan seri konsentrasi pengenceran mulai dari 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%. Kontrol positif menggunakan bakteri uji *S. aureus* pada tabung terakhir dan

pada tabung pertama diisi kontrol negatif menggunakan ekstrak konsentrasi 50%. Masukkan media BHI pada tabung 2 sampai tabung kelas 11, lalu masukkan larutan ekstrak sebanyak 2 ml pada tabung ke 1 dan larutan ekstrak sebanyak 1ml pada tabung ke 2. Langkah selanjutnya pipet 1 ml dari tabung ke 2 dan dimasukkan tabung 3 lalu homogenkan hingga tercampur begitu seterusnya sampai tabungkan 11 kemudian sisanya dibuang. Masing-masing tabung dari tabung ke 2 sampai tabung ke 11 ditambahkan dengan 1 ml suspensi bakteri *S. aureus* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil lalu diamati dari larutan yang jernih lalu dilanjut pada proses penggoresan ke media selektif VJA. Konsentrasi ekstrak yang dapat membunuh bakteri ditandai dengan daerah yang tidak ditumbuhi koloni bakteri artinya menunjukkan konsentrasi bunah minimal sebagai nilai KBM .

15. Pembuatan kombinasi ekstrak etanol daun kemangi dan ekstrak etanol daun sirsak

Kombinasi ekstrak diawali dengan membuat larutan stok daun kemangi dan daun sirsak dari konsentrasi hasil KBM pengujian dilusi, kemudian ambil larutan stok daun kemangi dan daun sirsak masing-masing 1 ml lalu di homogenkan.

15.1. Pembuatan kombinasi ekstrak daun kemangi dan ekstrak daun sirsak 1:1. Langkah pembuatan kombinasi ekstrak dilakukan dengan mengambil 1 KBM ekstrak etanol daun kemangi : 1 KBM ekstrak etanol daun sirsak masing-masing sebanyak 1 ml lalu homogenkan.

15.2. Pembuatan kombinasi ekstrak daun kemangi dan ekstrak daun sirsak 1:2. Langkah pembuatan kombinasi ekstrak dilakukan dengan mengambil 1 KBM ekstrak etanol daun kemangi : 2 KBM ekstrak etanol daun sirsak masing-masing sebanyak 1 ml lalu homogenkan.

15.3. Pembuatan kombinasi ekstrak daun kemangi dan ekstrak daun sirsak 2:1. Langkah pembuatan kombinasi ekstrak dilakukan dengan mengambil 2 KBM ekstrak etanol daun kemangi : 1 KBM ekstrak etanol daun sirsak masing-masing sebanyak 1 ml lalu homogenkan.

16. Uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak daun kemangi dan daun sirsak

Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Metode ini dengan kertas cakram dan

menggunakan kombinasi ekstrak daun kemangi dan daun sirsak dengan perbandingan (1:1); (1:2); (2:1), kontrol negatif menggunakan DMSO 10%, kontrol positif menggunakan cakram disks kloramfenikol. Bakteri diambil dari media BHI menggunakan kapas lidi steril lalu dioles pada cawan petri yang berisi media MHA 30 ml dan tunggu sampai bakteri terdifusi pada media.

Masing-masing larutan uji dipipet sebanyak 50 µl teteskan pada kertas cakram tunggu 10 menit dan ditaruh di atas media inokulum. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C setelah itu amati zona bening yang terbentuk dan ukur. Pengukuran zona hambat dilakukan menggunakan jangka sorong atau penggaris dengan ketelitian 1 mm. Hasil pengukuran dijumlah dan dibagi dengan banyaknya percobaan untuk mendapatkan besar zona hambatan yang dibentuk (Fitriana *et al.*, 2019).

17. Penentuan pola kombinasi

Adanya interaksi pada ekstrak daun kemangi dan daun sirsak dapat diamati secara visual terhadap pola yang muncul setelah dikombinasikan menggunakan metode difusi pita kertas. Metode ini menggunakan kertas *whatman* (No.1) dengan ukuran 3 x 0,5 cm. Penentuan efek dilakukan dengan cara, kertas ditetesi dengan larutan uji masing-masing ekstrak sebanyak 50µl dan tunggu 10 menit lalu ditempatkan membentuk sudut 90° pada cawan petri yang berisi media uji.

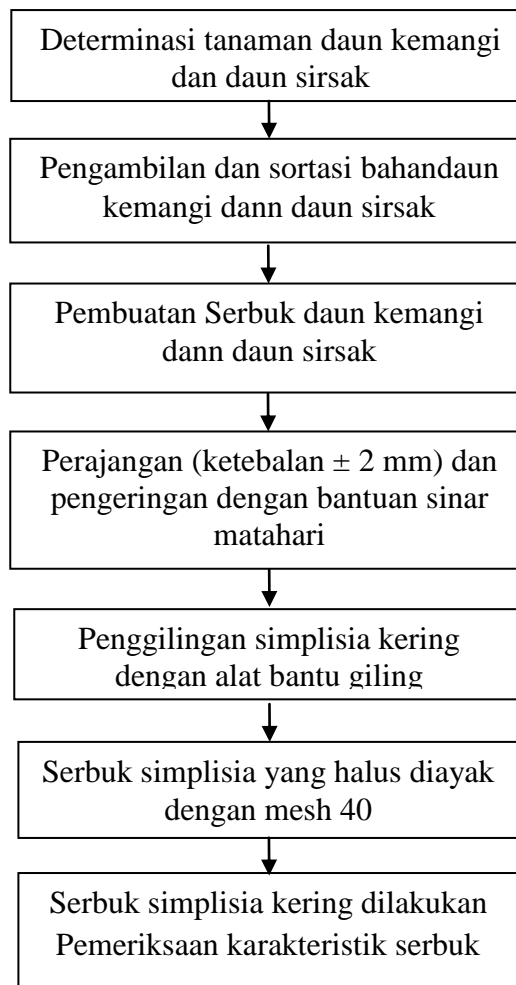
Efek kombinasi dikategorikan berdasarkan zona hambat yang terbentuk di pertemuan kedua pita pada sudut 90°. Efek sinergis apabila peningkatan zona hambat pada pertemuan dua pita di sudut 90°, efek antagonis dinyatakan jika terjadi pengecilan pada daerah zona hambat pada pertemuan kedua pita di sudut 90°, dan efek adiktif apabila terbentuk zona hambat pada masing masing kertas pita tanpa adanya perbesaran atau pengecilan pada sudut 90° (Hamni *et al.*, 2022).

E. Analisis Hasil

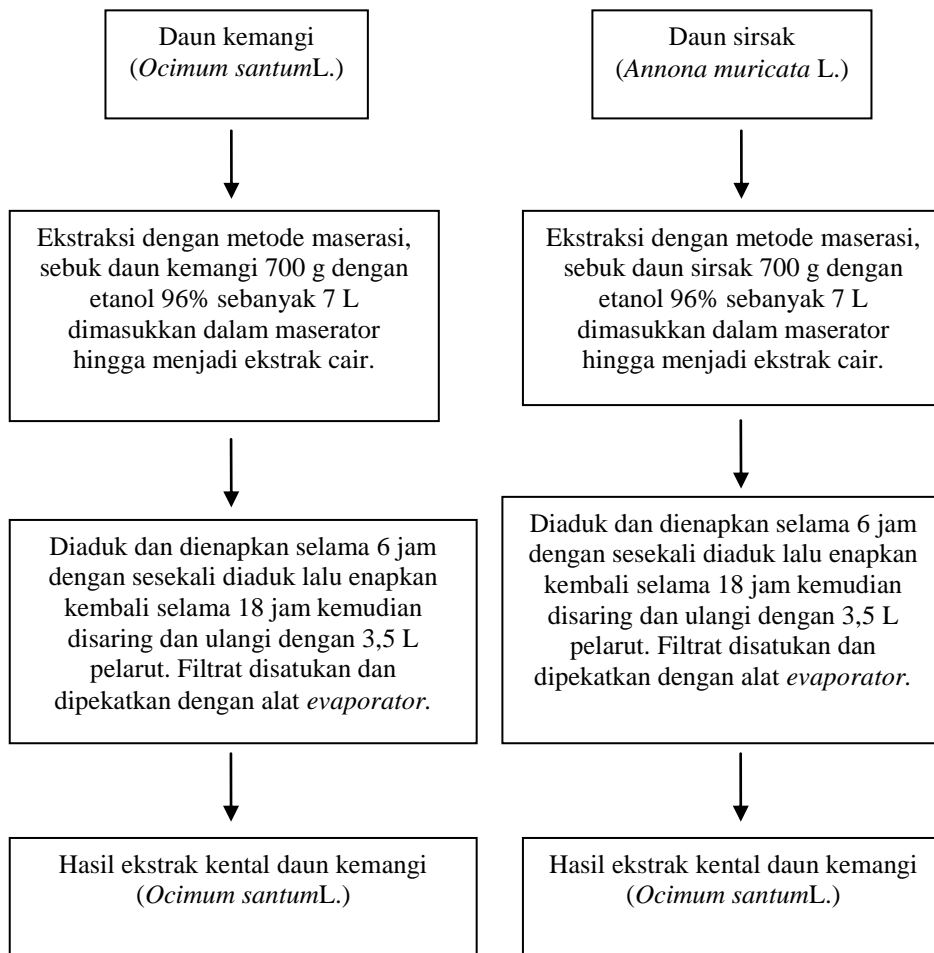
Analisis hasil yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan membandingkan ekstrak tunggal daun kemangi dan daun sirsak dengan kombinasi pada daun kemangi dan daun sirsak dengan perbandingan (1:1); (1:2); dan (2:1) terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Hasil data yang diperoleh lalu dianalisis dengan menggunakan (SPSS) *Statistical Product and Service Solutions* versi 24. Uji distribusi

normalitas dengan uji *Saphiro-Wilk* dilakukan dalam penelitian ini untuk melihat data terdistribusi normal atau tidak. Data yang terdistribusi normal ($p > 0,05$), selanjutnya dianalisis dengan *Levene Statistic* untuk melihat apakah data homogen ($p > 0,05$). Uji dilanjutkan dengan metode ANOVA menggunakan *one way* untuk nilai yang signifikan ($p < 0,05$). Analisis selanjutnya menggunakan uji *Post Hoc Turkey*. Test dilakukan untuk mengetahui perlakuan manakah yang berbeda secara signifikan, namun jika hasil uji distribusi tidak normal ($p < 0,05$), uji ANOVA diganti dengan pengujian non parametrik menggunakan pengujian *Kruskal Wallis*.

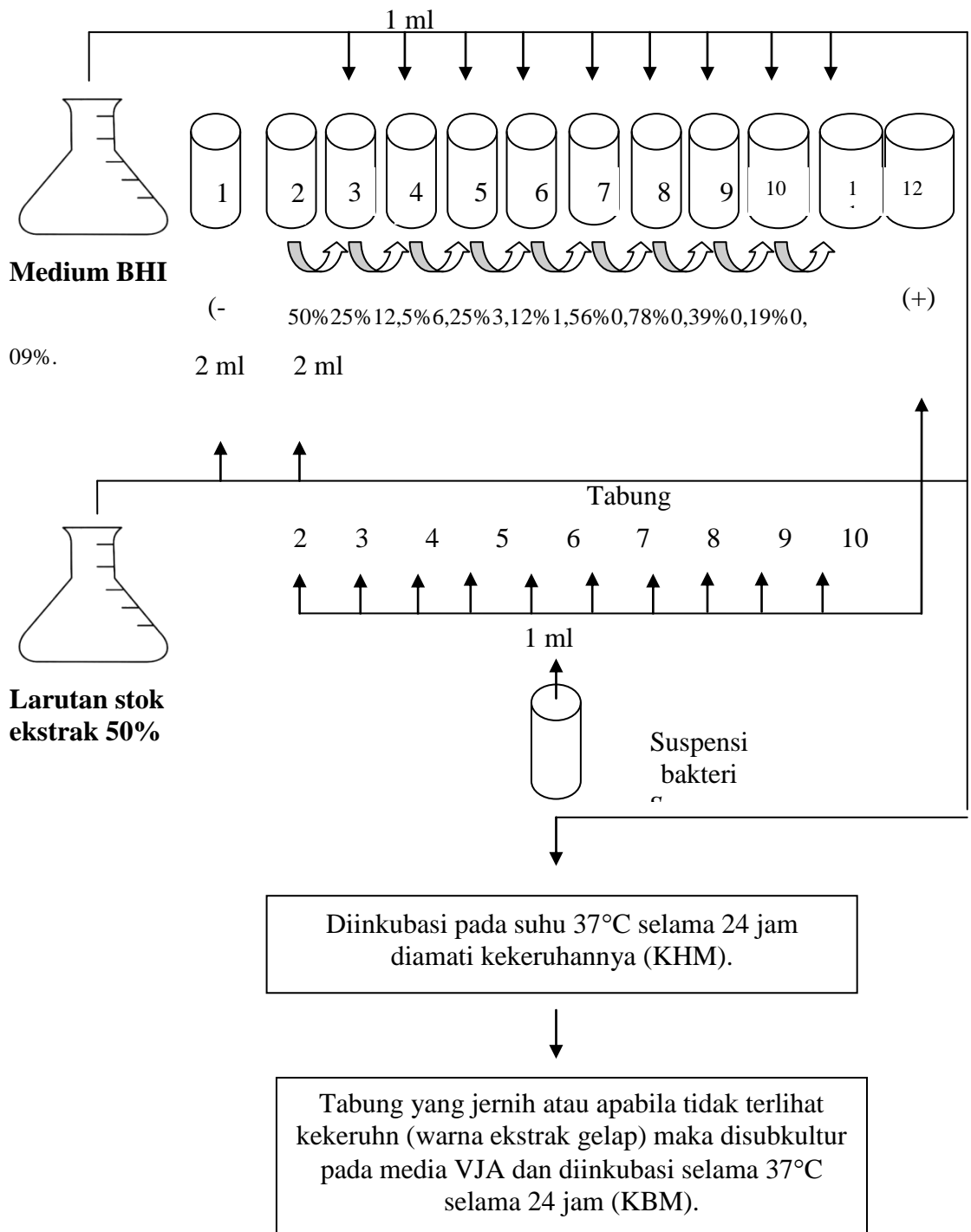
F. Skema Penelitian



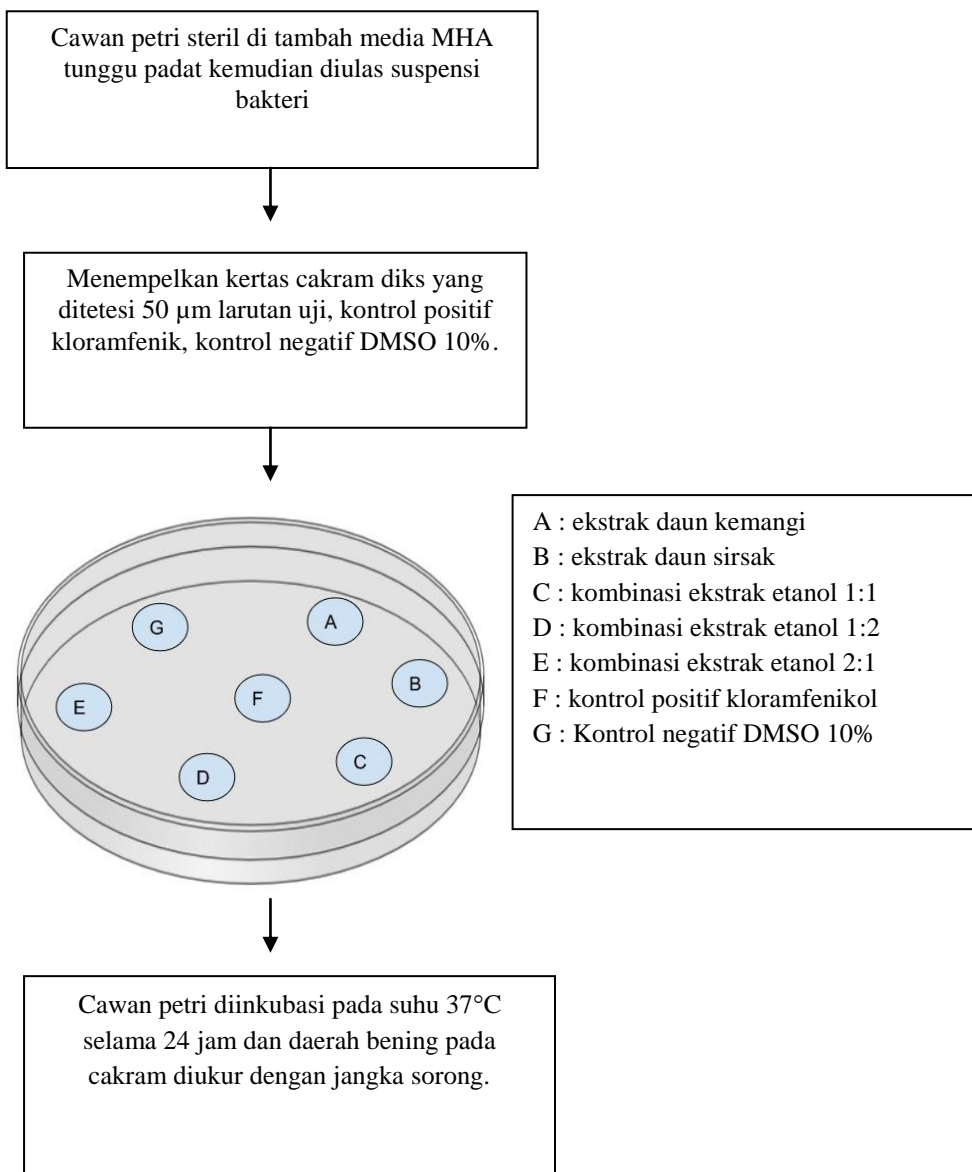
Gambar 6. Identifikasi tanaman.



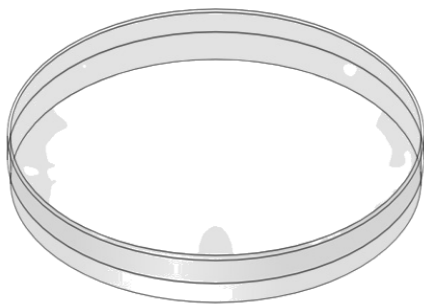
Gambar 7. Skema pembuatan ekstrak daun kemangi dan daun sirsak.



Gambar 8. Uji dilusi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.



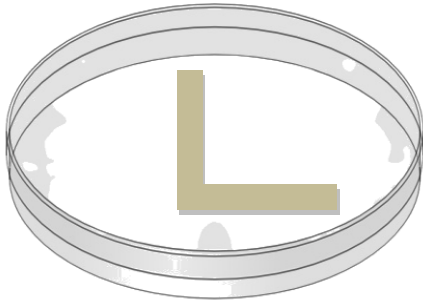
Gambar 9. Uji difusi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.



Suspensi bakteri dari BHI diambil dengan kapas lidi steril ulaskan pada media MHA pada cawan petri.



Pita kertas ditetaskan ekstrak daun kemangi dan ekstrak daun sirsak.



Pita kertas lalu diletakkan di media pada cawan petri yang mengandung suspensi bakteri, dengan pertemuan kedua kertas membentuk sudut 90°.



Cawan petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pola akan terbentuk disekitar kertas.

Gambar 10. Uji difusi pita kertas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.