

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian merupakan keseluruhan subjek atau objek yang memiliki karakteristik tertentu yang relevan untuk dianalisis guna memperoleh kesimpulan yang akurat (Darwin *et al*, 2021). Populasi dalam penelitian ini mencakup tanaman daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) dan daun sirih hijau (*Piper bettle* L.) yang tumbuh di wilayah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

Sampel penelitian berupa daun kumis kucing dan daun sirih hijau yang diperoleh dari Desa Gondosuli, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Kriteria inklusi sampel meliputi kondisi daun yang segar, bebas dari kerusakan fisik, serta tidak menunjukkan tanda-tanda serangan penyakit atau hama. Daun kumis kucing dipilih dalam kondisi utuh, hijau, dan sehat, sedangkan daun sirih hijau dipilih dari daun yang berwarna hijau cerah, tidak terlalu tua, dan memiliki tekstur segar. Teknik pengambilan sampel dilakukan secara acak untuk menghindari bias dalam proses seleksi bahan baku.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama penelitian ini yaitu aktivitas antibakteri ekstrak etanol tunggal dari daun kumis kucing dan daun sirih hijau terhadap *Escherichia coli* .

Variabel utama kedua dari penelitian adalah konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari masing-masing ekstrak etanol (daun kumis kucing dan daun sirih hijau) yang diperlukan untuk membunuh *Escherichia coli* .

Variabel utama ketiga dari penelitian adalah efek kombinasi ekstrak etanol daun kumis kucing dan daun sirih hijau terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* , dengan perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1

Variabel utama keempat dari penelitian adalah efek kombinasi antara ekstrak etanol daun kumis kucing dan daun sirih hijau dalam menghambat *Escherichia coli*

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang sudah ditetapkan diidentifikasi pada beragam jenis variabel diantaranya variabel bebas, tergantung serta terkendali.

Variabel bebas adalah faktor yang dilakukan variasi perubahan atau perlakuan oleh peneliti untuk mengamati dampaknya. Variabel bebas penelitian ini meliputi ekstrak etanol daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang diuji dalam berbagai konsentrasi bertingkat yaitu 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 %.

Variabel tergantung merupakan hasil atau respons yang diukur dan menjadi indikator keberhasilan penelitian. Variabel tergantung penelitian ini berfokus pada aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*.

Variabel terkontrol merupakan faktor yang berpotensi memengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dijaga konstan guna memastikan validitas data dan kemudahan replikasi penelitian. Pengendalian variabel ini bertujuan untuk meminimalkan potensi bias dalam hasil penelitian. Dalam penelitian ini, variabel terkontrol meliputi metode pembuatan ekstrak kental, jenis dan kondisi peralatan laboratorium yang digunakan, serta standar lingkungan dan kondisi laboratorium selama proses penelitian berlangsung.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kumis kucing dan daun sirih hijau adalah daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) diperoleh dari wilayah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Daun yang telah dikumpulkan dicuci, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 2 hingga 3 hari. Setelah proses pengeringan, daun dihaluskan menjadi serbuk kering dan disaring menggunakan ayakan mesh nomor 40

Kedua, ekstrak daun kumis kucing dan ekstrak daun sirih hijau adalah ekstrak etanol daun kumis kucing dan ekstrak etanol daun sirih hijau diperoleh melalui proses maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak yang dihasilkan kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C untuk menghilangkan pelarut.

Ketiga, bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri *Escherichia coli* digunakan sebagai bakteri uji dan diperoleh dari Laboratorium Universitas Setia Budi, Surakarta.

Keempat, uji aktivitas antibakteri metode difusi adalah Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar untuk mengamati zona hambat pertumbuhan bakteri terhadap kombinasi ekstrak etanol daun kumis kucing dan daun sirih hijau. Hasil

diinterpretasikan sebagai efek sinergis, aditif, atau antagonis.

Kelima, uji aktivitas antibakteri metode dilusi adalah pengujian dengan menggunakan konsentrasi bertingkat ekstrak, mulai dari 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, hingga 0,78% dalam untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

Keenam, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak yang mampu membunuh bakteri uji secara menyeluruh. Penentuan nilai KBM dilakukan dengan mengamati adanya pertumbuhan atau ketiadaan koloni bakteri pada media setelah proses inkubasi selama 18–24 jam pada suhu 37°C.

Ketujuh, efek kombinasi dua ekstrak dievaluasi menggunakan metode pita kertas. Dua potongan pita kertas steril yang telah ditetesi masing-masing ekstrak diletakkan saling tegak lurus membentuk huruf “L” di atas medium agar yang telah diinokulasi bakteri uji, kemudian dilakukan inkubasi.

Kedelapan, pola efek sinergis adalah kondisi di mana kombinasi dua ekstrak menunjukkan daya hambat antibakteri yang lebih besar dibandingkan dengan aktivitas ekstrak secara individu.

Kesembilan, pola efek antagonis adalah menggambarkan interaksi dua ekstrak yang justru menurunkan efektivitas antibakteri dibandingkan dengan aktivitas masing-masing ekstrak tunggal.

Kesepuluh, pola efek aditif adalah kondisi ketika kombinasi dua ekstrak menghasilkan aktivitas antibakteri yang setara dengan penjumlahan efek dari masing-masing ekstrak tunggalnya.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat pada penelitian ini diantaranya timbangan analitik, blender, ayakan serbuk mesh 40, perangkat ekstraksi maserasi, krimas ukur, beaker glass, objek glass, cawan porselin, batang pengaduk, water bath, rotary evaporator, pH meter, tabung reaksi, pipet tetes, serta peralatan spesifik untuk uji katalase dan koagulasi seperti jarum ose, pipet volume, objek glass, deck glass, tabung reaksi, bunsen corong, kain flanel, LAF, vortex mixer, jangka sorong, korek api, rak tabung reaksi, cawan petri, lampu spiritus, jarum ose, pinset, kapas, label, inkubator, autoclave, oven, mikropipet, boor prop, ent-kas, kertas coklat, dan pipet pasteur steril

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel pada penelitian ini yaitu daun kumis kucing dan daun sirih hijau didapat dari wilayah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia pada penelitian ini diantaranya reagen Dragendorff, Wagner, H_2SO_4 , CH_3COOH , dan HCl pekat, serta logam Mg, air hangat, dan $FeCl_3$. Untuk pewarnaan, digunakan kristal violet, lugol iodine, etanol 96% atau aseton, dan safranin. Penelitian ini juga menggunakan bakteri *E. coli*, Ciprofloxacin sebagai kontrol, larutan *McFarland*, serta media Muller Hinton Agar (MHA), Nutrient Agar (NA), EA, SIM, dan KIA.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman dan Pengambilan bahan

Determinasi tanaman merupakan prosedur identifikasi karakteristik morfologi suatu tanaman berdasarkan panduan standar taksonomi. Proses ini bertujuan untuk memastikan keaslian dan kesesuaian spesimen yang digunakan dalam penelitian (Diniatik, 2015). Determinasi terhadap daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Pengambilan sampel tanaman dilakukan di Desa Gondosuli, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel yang dipilih merupakan daun muda yang masih segar, berwarna hijau cerah, tidak mengalami kerusakan fisik, serta bebas dari serangan hama. Tahap determinasi dilakukan untuk memverifikasi keaslian spesimen tanaman kumis kucing dan sirih hijau sebagai bahan penelitian.

2. Pembuatan serbuk daun kumis kucing dan daun sirih hijau

Daun kumis kucing dan daun sirih hijau yang baru dipanen terlebih dahulu melalui proses sortasi basah untuk memisahkan bahan asing dan kontaminan, kemudian dicuci dengan air bersih yang mengalir. Setelah dibersihkan, daun disusun rapi dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di bawah sinar matahari tidak langsung untuk menghindari kerusakan senyawa aktif akibat paparan panas berlebih. Daun yang telah kering menjalani proses sortasi kering untuk memisahkan bagian yang rusak. Proses dilanjutkan dengan penghalusan menggunakan blender hingga menjadi serbuk, kemudian diayak dengan menggunakan ayakan mesh nomor 40 untuk

memperoleh ukuran partikel yang seragam. Serbuk kering yang dihasilkan disimpan dalam wadah plastik tertutup untuk menjaga kestabilan mutu selama penyimpanan.

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

3. Identifikasi serbuk daun kumis kucing dan daun sirih hijau

3.1 Uji organoleptis. Serbuk daun kumis kucing dan daun sirih hijau diidentifikasi secara organoleptis. Identifikasi dilakukan dengan pengamatan organoleptis berupa bentuk, warna, serta aroma serbuk daun kumis kucing yang diuji dengan menggunakan panca indra secara subjektif.

3.2 Uji Mikroskopis serbuk daun kumis kucing dan daun sirih hijau. Uji mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia dengan cara meletakkan serbuk diatas objek glass kemudian ditetesi akuades kemudian ditutup dengan cover glass lalu diamati fragmen pengenalan secara umum yang dilakukan melalui pengamatan dibawah mikroskop (Handayani *et al.*, 2019).

3.3 Penetapan susut pengeringan serbuk daun kumis kucing dan daun sirih hijau. Pengukuran susut pengeringan dilakukan menggunakan *moisture balance* pada suhu 105°C, menimbang 2 gram serbuk daun kumis kucing dan daun sirih hijau dan memasukkannya ke dalam *moisture balance* sampai berat yang konsisten tercapai, lalu hasil ditampilkan di layar monitor dan dicatat. Pengeringan yang efektif mencapai susut kurang dari 10% (Kemenkes, 2017).

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{\text{bobot awal}-\text{bobot akhir}}{\text{bobot akhir}} \times 100\%$$

4. Pembuatan ekstrak daun kumis kucing dan daun sirih hijau secara maserasi

Serbuk simplisia daun kumis kucing dan daun sirih hijau, masing-masing seberat 500 gram, diekstraksi menggunakan metode maserasi. Proses ini melibatkan pencampuran serbuk dengan pelarut etanol 96% dalam rasio 1:10 (b/v). Setelah proses maserasi selesai, ekstrak yang dihasilkan kemudian dipekatkan. Pemekatan dilakukan dengan rotary evaporator pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental (Kemenkes, 2017).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak Pekat}}{\text{Berat Serbuk Simplisia}} \times 100\%$$

5. Identifikasi ekstrak kental daun kumis kucing dan daun sirih hijau

5.1 Uji organoleptis. Identifikasi organoleptis dilakukan pada ekstrak daun kumis kucing dan daun sirih hijau. Penilaian dilakukan dengan mengamati tampilan organoleptis seperti bentuk, warna, dan aroma dari ekstrak daun kumis kucing yang sedang diuji.

5.2 Penetapan kadar air ekstrak. Pengukuran kadar air ekstrak dilakukan melalui teknik gravimetri. Timbangan 10 g ekstrak etanol daun kumis kucing dan daun sirih hijau dimasukkan ke dalam kurs, kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C, tunggu hingga layar menunjukkan penurunan berat sampel. Pengukuran selesai ketika bobot stabil dan persentasenya ditampilkan. Teruskan prosedur pengeringan dengan menimbang ulang setiap 1 jam hingga terdapat selisih 2 pengukuran secara berurutan namun tidak melebihi 0,25% (Kemenkes RI, 2017).

5.3 Uji bebas etanol. Tujuan uji ini dilakukan untuk memastikan bahwa ekstrak telah bebas dari etanol maupun senyawa ester yang terbentuk selama proses ekstraksi. Prosedur uji diawali dengan penambahan campuran asam asetat dan asam sulfat pekat ke dalam tabung reaksi yang berisi ekstrak. Tabung reaksi dipanaskan untuk memicu reaksi esterifikasi. Indikasi keberadaan etanol ditunjukkan dengan tercium aroma khas ester alkohol. Apabila terdeteksi aroma ester, maka ekstrak dinyatakan masih mengandung residu etanol.

6. Identifikasi kandungan senyawa

6.1. Flavonoid. Pengujian flavonoid dilakukan dengan melarutkan 0,1 gram ekstrak dalam 10 mL akuades, kemudian dipanaskan dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan serbuk magnesium dan 20 tetes HCl pekat, diikuti dengan 20 tetes amil alkohol, lalu dikocok kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan perubahan warna lapisan amil alkohol menjadi merah, jingga, atau kuning. Warna jingga hingga merah menunjukkan flavon, merah hingga merah tua menunjukkan flavanol, dan merah tua hingga magenta menandakan flavanon (Harborne, 1987)

6.2. Tanin. Uji tanin dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak dalam 3 mL akuades, kemudian dipanaskan dan disaring. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan 1–2 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru atau hijau tua (Harbone, 1987).

6.3. Alkaloid. Pengujian alkaloid dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak ke dalam 1 mL HCl 2 N dan 9 mL akuades, dipanaskan, kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi tiga bagian dan masing-masing ditambahkan pereaksi Mayer dan Dragendorff. Reaksi positif ditandai dengan endapan putih (Mayer) dan jingga-cokelat (Dragendorff) (Harbone, 1987).

6.4. Saponin. Uji saponin dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak dalam 2 mL air panas, kemudian dikocok kuat selama 10 detik. Pembentukan busa stabil setinggi minimal 1 cm yang bertahan selama 10 menit, serta tidak menghilang setelah penambahan 1 tetes HCl 2 N, menunjukkan hasil positif saponin (Harbone, 1987).

6.5. Steroid. Pengujian steroid menggunakan metode Liebermann-Burchard. Ekstrak dilarutkan dalam kloroform dan ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard (campuran asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat). Perubahan warna merah kecokelatan menunjukkan keberadaan steroid, sedangkan perubahan warna cokelat-ungu menunjukkan keberadaan triterpenoid (Depkes, 1978).

7. Sterilisasi alat, bahan, dan media

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dicuci, dikeringkan, dan disterilkan menggunakan oven pada suhu 170–180°C selama 1–2 jam. Proses sterilisasi media pertumbuhan dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan 1 atm selama 15 menit untuk memastikan media bebas dari kontaminan mikroorganisme (Wulandari *et al.*, 2021).

8. Peremajaan bakteri

Isolat bakteri *Escherichia coli* diambil secara aseptis menggunakan ose steril. Isolat tersebut kemudian diinokulasikan pada media agar miring Nutrient Agar (NA). Setelah inokulasi, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Wijayanti dan Safitri, 2018).

9. Pembuatan Suspensi Mc Farland

Larutan suspensi bakteri dibuat dengan satu ose koloni bakteri diambil secara aseptis dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 ml larutan BHI fisiologis 0,9%. Suspensi ini kemudian dihomogenkan menggunakan vortex mixer. Kekeruhan suspensi selanjutnya disesuaikan dengan standar McFarland 0,5, yang setara dengan konsentrasi bakteri sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Jika larutan belum keruh tambahkan kembali satu ose koloni ke dalam larutan BHI dan hitung kembali dengan standar *Mc Farland* (Misna dan Khusnul, 2016).

10. Identifikasi bakteri

10.1. Identifikasi bakteri pada media EA (Endo Agar).

Identifikasi *Escherichia coli* diawali dengan inokulasi satu ose bakteri pada media Endo Agar (EA). Media ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Dewi, 2013). Pertumbuhan *E. coli* pada media EA ditandai dengan terbentuknya koloni berwarna merah mengkilap (*metallic sheen*), yang mengindikasikan hasil positif (Hayati *et al.*, 2019).

10.2. Identifikasi morfologi secara pewarnaan Gram.

Karakteristik morfologi dan klasifikasi Gram bakteri diamati menggunakan metode pewarnaan Gram. Proses dimulai dengan meneteskan larutan BHI atau akuades pada kaca objek, kemudian ditambahkan satu ose suspensi bakteri dan diratakan. Fiksasi dilakukan dengan pemanasan untuk mematikan bakteri tanpa merusak morfologi, sekaligus merekatkan preparat pada kaca objek. Pewarnaan dimulai dengan penambahan gentian violet (Gram A) selama 2 menit, lalu dibilas. Langkah berikutnya adalah penambahan larutan Lugol (Gram B) sebanyak 3 tetes selama 30 detik dan dibilas kembali. Proses dilanjutkan dengan penambahan alkohol 96% (Gram C) sebanyak 3 tetes hingga warna luntur, diakhiri dengan pewarnaan Safranin (Gram D) selama 2 menit. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x (Hayati *et al.*, 2019). *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram-negatif yang akan tampak berwarna merah, berbentuk batang, dengan susunan tersebar.

10.3. Identifikasi *E. coli* pada Media KIA, SIM, LIA, Sitrat

10.3.1. KIA. Isolat bakteri dari media EA diinokulasikan pada media KIA dengan teknik tusukan pada dasar media dan goresan pada bagian miring. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji ini mengevaluasi kemampuan fermentasi karbohidrat dan produksi sulfida. Hasil positif fermentasi ditunjukkan oleh perubahan warna kuning pada dasar media (A) dan warna merah pada lereng (K). Pembentukan gas ditandai dengan retakan, pecahnya media, atau terangkatnya media (G), sedangkan produksi hidrogen sulfida (H_2S) terdeteksi oleh terbentuknya endapan hitam (S+). Hasil positif juga dapat dituliskan A/AS-

10.3.2. SIM. Koloni diambil menggunakan ose dan diinokulasikan secara tusukan pada media SIM, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji positif sulfida ditunjukkan oleh warna

hitam pada media. Pembentukan indol ditandai dengan warna merah setelah penambahan reagen Erlich A dan B. Motilitas positif ditunjukkan dengan penyebaran pertumbuhan bakteri ke seluruh medium. Hasil tersebut bisa dituliskan dengan tanda (-++).

10.3.3. LIA. Bakteri diinokulasikan dengan teknik tusukan dan goresan pada media LIA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Uji ini mendeteksi aktivitas deaminase dan dekarboksilase lisin. Warna hitam menandakan produksi H₂S, warna merah pada lereng menunjukkan reaksi deaminasi lisin (R), sedangkan warna ungu menandakan reaksi dekarboksilasi lisin (K). Warna kuning pada media menunjukkan kondisi asam akibat fermentasi glukosa (A). Hasil positif juga dapat dituliskan K/KS-

10.3.4. Sitrat. solat diinokulasikan dengan teknik goresan dan tusukan pada media Simmons Citrate Agar, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Perubahan warna media menjadi biru menunjukkan hasil positif, menandakan kemampuan bakteri memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon. Hasil positif akan ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi hijau (-).

11. Aktivitas antibakteri ekstrak daun kumis kucing dan daun sirih hijau dengan dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kumis kucing dan daun sirih hijau dilakukan menggunakan metode pengenceran tabung (*tube dilution method*). Prosedur dimulai dengan menyiapkan sepuluh tabung reaksi steril yang telah diberi label konsentrasi bertingkat, yaitu 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781%, serta dua tabung tambahan untuk kontrol negatif dan kontrol positif. Kontrol negatif berisi 2 mL ekstrak tanpa inokulasi bakteri, sedangkan kontrol positif berisi 2 mL suspensi *Escherichia coli* tanpa ekstrak. Masing-masing tabung, kecuali kontrol negatif, ditambahkan 2 mL larutan BHI steril. Pengenceran serial dilakukan dengan mengambil 1 mL larutan dari tabung satu ke tabung berikutnya secara berurutan hingga mencapai konsentrasi terendah, kemudian 1 mL dari tabung terakhir dibuang untuk menjaga volume tetap. Suspensi bakteri *E. coli* sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan ke dalam tabung kedua hingga tabung kesembilan. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengamatan dilakukan terhadap tingkat kekeruhan larutan di setiap tabung. Konsentrasi ekstrak terendah yang menghasilkan media

jernih tanpa pertumbuhan bakteri ditetapkan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Penentuan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM), media dari tabung yang menunjukkan kejernihan diambil dan ditanam kembali secara goresan pada media, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18–24 jam. KBM ditetapkan berdasarkan konsentrasi terendah yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri, yang menunjukkan kemampuan ekstrak untuk bersifat bakterisidal secara optimal.

12. Pembuatan Kombinasi Ekstrak etanol daun kumis kucing dan daun sirih hijau

12.1. Pembuatan kombinasi ekstrak etanol daun kumis kucing dan daun sirih hijau perbandingan 1:1. Kombinasi menggunakan hasil uji dilusi untuk diteruskan untuk uji difusi. Sebanyak 0,25 gram ekstrak etanol daun kumis kucing akan dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10%. Kemudian, 0,25 gram ekstrak etanol daun sirih hijau juga akan dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10%. Setelah kedua ekstrak terlarut sempurna, 1 mL dari masing-masing larutan ekstrak tersebut akan dipipet, lalu dicampurkan dan dihomogenkan.

12.2. Pembuatan kombinasi ekstrak etanol daun kumis kucing dan daun sirih hijau perbandingan 1:2. 0,25 gram ekstrak daun kumis kucing akan dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10%. Secara bersamaan, 0,5 gram ekstrak etanol daun sirih hijau juga akan dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10%. Selanjutnya, 1 mL dari masing-masing larutan ekstrak ini akan dipipet, kemudian dicampurkan dan dihomogenkan.

12.3. Pembuatan kombinasi ekstrak etanol daun kumis kucing dan daun sirih hijau perbandingan 2:1. 0,5 gram ekstrak etanol daun kumis kucing akan dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10%. Secara bersamaan, 0,25 gram ekstrak etanol daun sirih hijau juga akan dilarutkan dalam 2 mL DMSO 10%. Setelah kedua ekstrak terlarut sempurna, masing-masing 1 mL larutan ekstrak tersebut akan dipipet, lalu dicampurkan dan dihomogenkan.

13. Aktivitas antibakteri ekstrak daun kumis kucing dan daun sirih hijau dengan difusi

Pengujian aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dilakukan menggunakan metode difusi cakram untuk menentukan diameter zona hambat terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*.

Suspensi bakteri *E. coli* disebarkan secara merata pada permukaan medium Mueller Hinton Agar (MHA) dengan menggunakan metode *strike* dalam cawan petri. Lakukan pembuatan lubang media dengan *bor hole* steril kemudian ditetesi masing-masing 50 µL larutan uji yang terdiri atas kombinasi ekstrak dengan rasio 1:1, 1:2, dan 2:1, serta kontrol positif berupa ciprofloxacin dan kontrol negatif menggunakan BHI 0,9%. Lubang yang telah ditetesi diinokulasi bakteri, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang diukur menggunakan jangka sorong dan dinyatakan dalam satuan milimeter. Pengujian dilakukan dalam tiga kali replikasi guna memastikan validitas dan reliabilitas hasil (Andriani *et al.*, 2016).

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

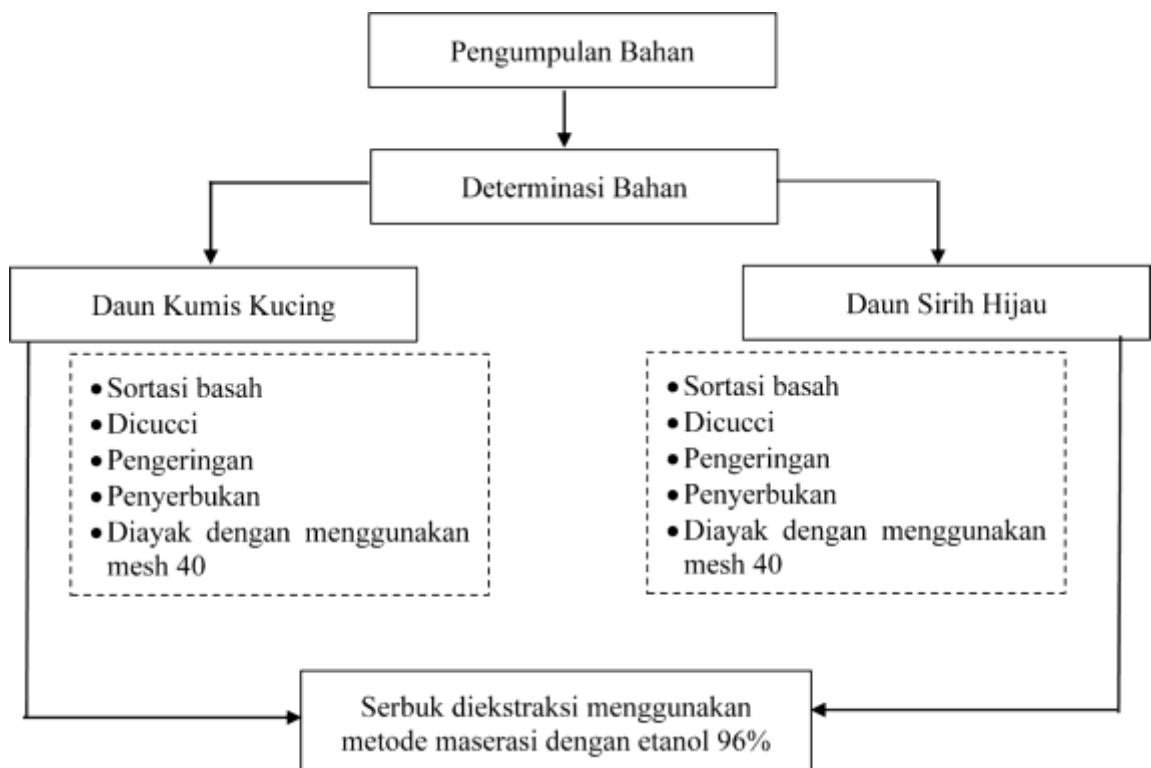
Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efek kombinasi antara ekstrak etanol daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) dan daun sirih hijau (*Piper betle L.*) yang sebelumnya telah melalui proses optimasi dengan menggunakan uji difusi yang dilakukan. Pengujian dilakukan menggunakan metode pita kertas untuk menilai potensi interaksi sinergis antar kedua ekstrak. Pita kertas steril berukuran $0,5 \times 3$ cm (kertas Whatman No. 1) digunakan sebagai media aplikasi ekstrak (Astuti., *et al.* 2022). Penggunaan kertas saring Whatman Nomor 1 dalam metode difusi antibakteri didasarkan pada karakteristik fisik dan kimia kertas tersebut yang ideal untuk proses difusi zat aktif (ekstrak herbal atau antibiotik) ke dalam media agar padat. Setiap pita ditetaskan masing-masing 50 µL ekstrak etanol daun kumis kucing dan ekstrak etanol daun sirih hijau, kemudian didiamkan selama 5 menit agar larutan terserap sempurna. Setelah itu, kedua pita diletakkan saling tegak lurus di atas permukaan media agar yang telah diinokulasi bakteri uji, sehingga membentuk sudut 90° menyerupai huruf “L” dengan salah satu ujung pita saling tumpang tindih. Cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Evaluasi efek kombinasi dilakukan dengan mengamati terbentuknya zona hambat berupa area jernih di sekitar titik pertemuan kedua pita (Novitri & Kurniati, 2021). Zona jernih tersebut menjadi indikator adanya interaksi antibakteri antar kedua ekstrak.

E. Analisis Hasil

Analisis hasil penelitian ini dilakukan dengan membandingkan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kumis kucing, ekstrak etanol daun sirih hijau, serta kombinasi keduanya terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS versi 25. Uji normalitas data dilakukan dengan metode *Shapiro-Wilk*, sedangkan homogenitas varians diuji menggunakan *Levene's test*. Apabila data berdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen, maka analisis dilanjutkan dengan uji parametrik *ANOVA* satu arah. Sebaliknya, jika data tidak berdistribusi normal atau tidak homogen, maka digunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* untuk menguji perbedaan antar kelompok perlakuan.

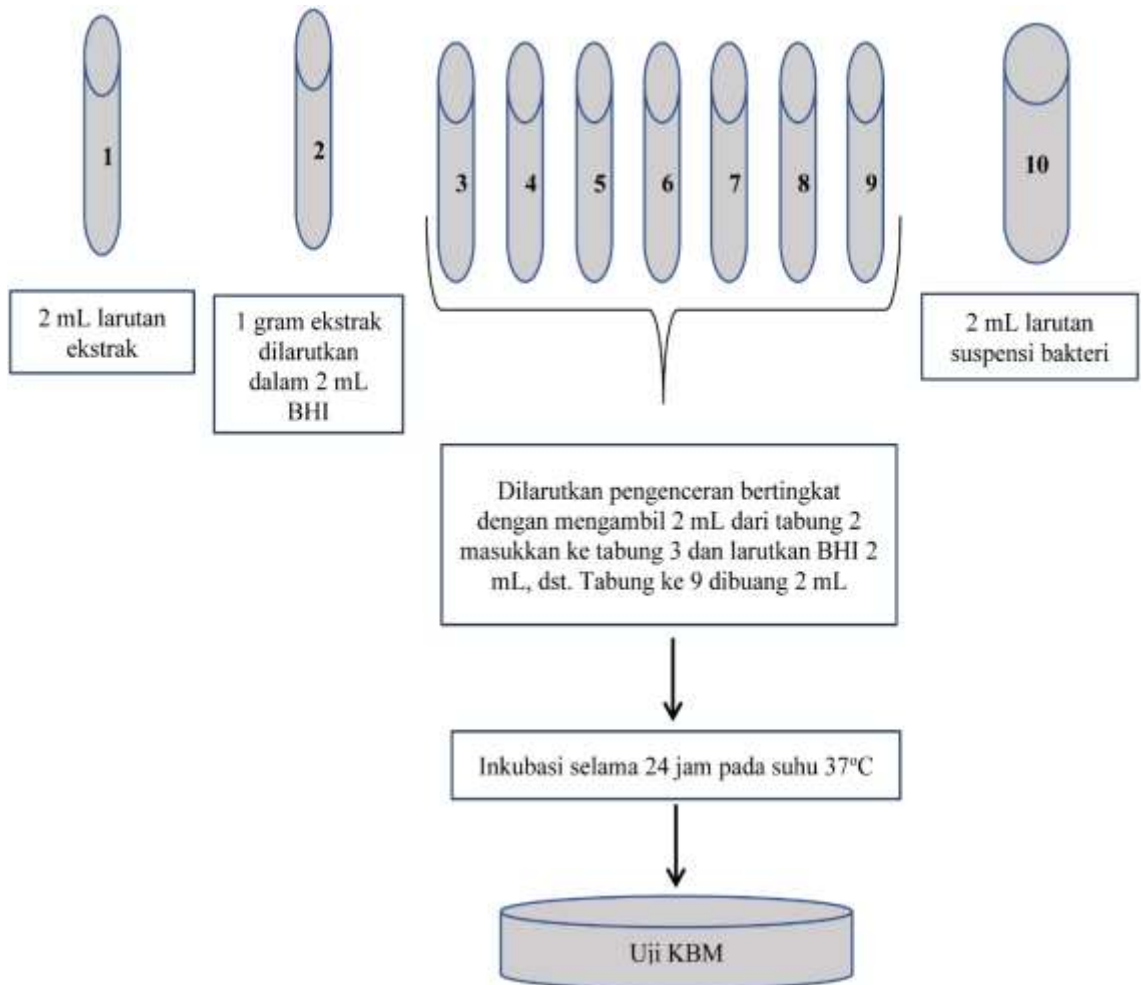
F. Diagram Alir

1. Skema pembuatan Ekstrak



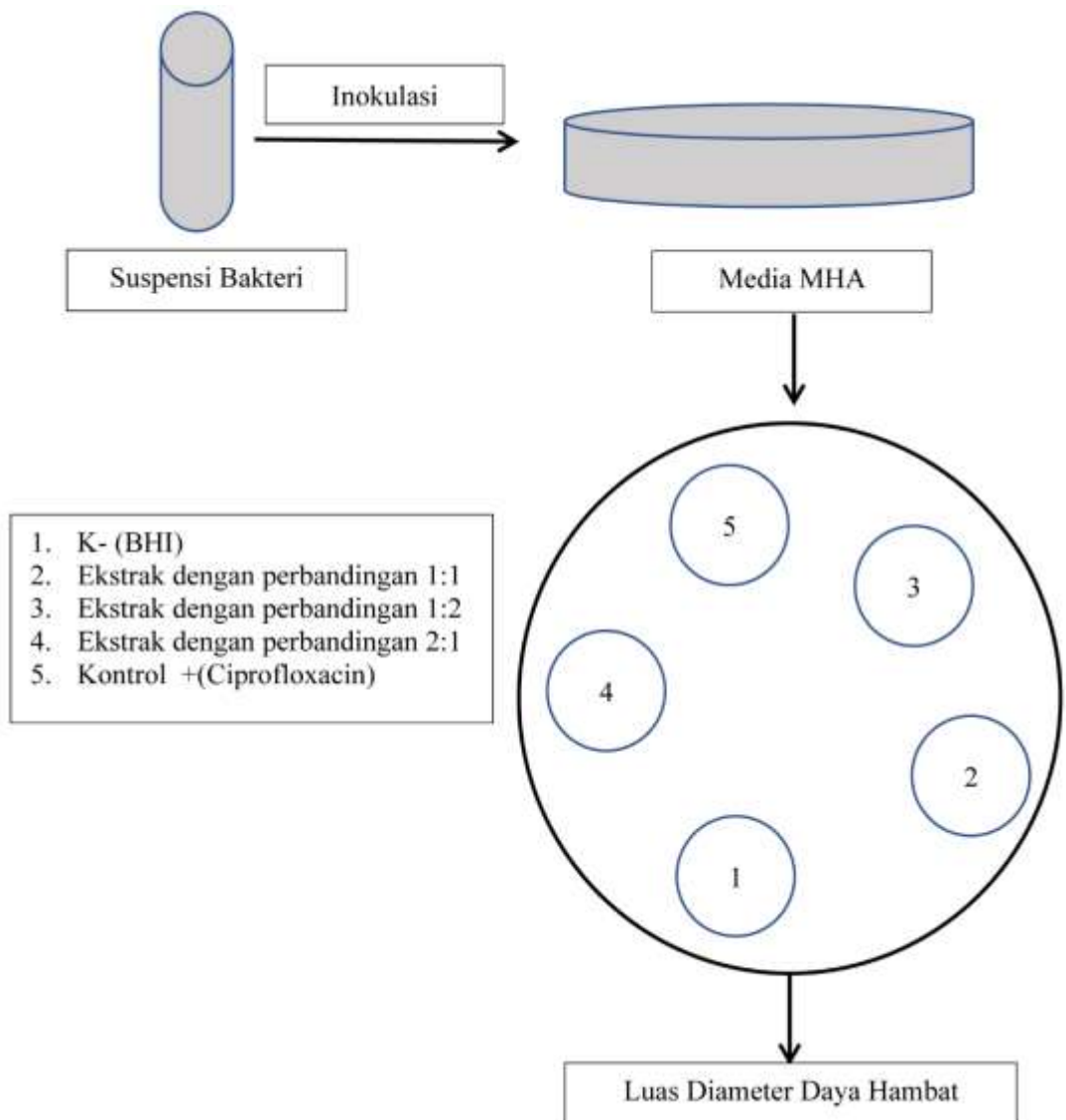
Gambar 3. Skema pembuatan Ekstrak

2. Uji Aktivitas Antibakteri Daun Kumis Kucing dan Daun Sirih Hijau (Dilusi)



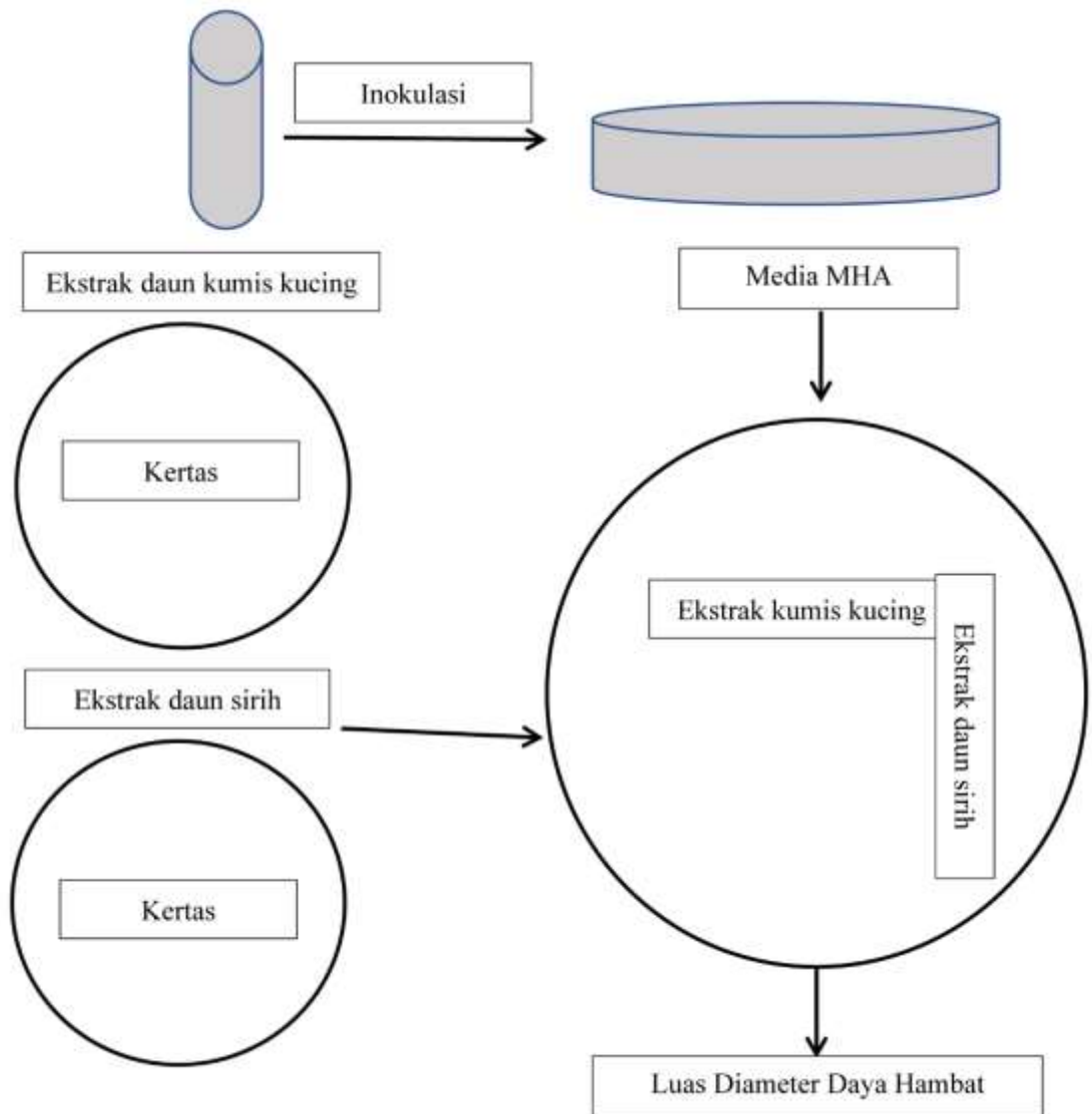
Gambar 4. Uji Aktivitas Antibakteri Daun Kumis Kucing dan Daun Sirih Hijau (Dilusi)

3. Uji Aktivitas Antibakteri Daun Kumis Kucing dan daun sirih hijau (Difusi)



Gambar 5. Skema uji aktivitas antibakteri daun kumis kucing

4. Uji antibakteri kombinasi ekstrak daun kumis kucing dan daun sirih



Gambar 6. Skema uji aktivitas antibakteri daun kumis kucing