

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi adalah objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi penelitian ini adalah biji pinang dan daun kelor yang diambil dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

##### **2. Sampel**

Sampel adalah bagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel pada penelitian ini yaitu biji pinang dan daun kelor, biji pinang dipetik yang sudah matang dengan kulit buah berwarna kuning kecoklatan serta konsistensi buah yang keras, daun kelor dipetik secara acak mengambil daun yang tidak terlalu tua dan masih berwarna hijau, segar dan dalam kondisi bebas penyakit atau hama.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama pertama yang diidentifikasi dalam penelitian adalah ekstrak etanol kombinasi Biji Pinang dan Daun Kelor.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 96% kombinasi Biji Pinang dan Daun Kelor terhadap *Escherichia coli*.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak etanol dengan perbandingan 1:1, 1:2 dan 2:1 dari biji pinang dan daun kelor terhadap bakteri *Escherichia coli*

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

**2.1 Variabel Bebas.** Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah- ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi ekstrak etanol 96% dari biji pinang dan daun kelor dengan perbandingan (1:1), (1:2) dan (2:1).

**2.2 Variabel Terkendali.** Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli*, media, suhu, sterilisasi, kondisi laboratorium, kondisi peneliti dan metode penelitian.

**2.3 Variabel Tergantung.** Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol kombinasi biji pinang dan daun kelor terhadap *Escherichia coli* yang dapat dilihat dari diameter daya hambat dan pola kombinasi.

### **3. Definisi Operasional Variabel Utama**

Pertama, buah pinang adalah buah yang dipetik yang sudah matang ditandai dengan kulit buah berwarna kuning kecoklatan serta konsistensi buah yang keras.

Kedua, biji pinang dan daun kelor diambil secara acak di wilayah di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Buah pinang dipetik yang sudah matang ditandai dengan kulit buah berwarna kuning kecoklatan serta konsistensi buah yang keras, daun kelor dipetik secara acak mengambil daun yang tidak terlalu tua dan masih berwarna hijau, segar dan dalam kondisi bebas penyakit atau hama.

Ketiga, biji pinang yang sudah dicuci dengan air mengalir, buah pinang yang telah dibersihkan dibelah dan bagian biji dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Daun kelor yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Kemudian kedua sampel dibuat serbuk menggunakan alat blender sampai terbentuk serbuk kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 dan 60.

Keempat, ekstrak tunggal Biji Pinang adalah ekstrak kental yang dihasilkan dari metode ekstraksi berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia berupa maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan diuapkan sampai memperoleh ekstrak kental.

Kelima, ekstrak daun kelor adalah ekstrak kental yang dihasilkan dari metode ekstraksi berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia berupa maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan diuapkan sampai memperoleh ekstrak kental.

Keenam, bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah untuk *Escherichia coli* dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketujuh, adalah kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah siprofloksasin.

Kedelapan, kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah DMSO 10% yang berfungsi sebagai pengencer yang digunakan dalam pembuatan konsentrasi kombinasi.

Kesembilan, metode uji yang digunakan adalah uji dilusi yang bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi menurun atau konsentrasi terbesar hingga terkecil. Konsentrasi yang digunakan dimulai dari konsentrasi 60%, 30%, 15%, 7,5%, 3,75%, 1,87%, 0,93%, 0,46%

Kesepuluh, Metode uji yang digunakan adalah difusi untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji, diameter zona hambat dengan perbandingan (1:1), (1:2) dan (2:1) dihasilkan adalah zona bening yang disekitar cakram berisi sampel.

### **C. Alat Dan Bahan**

#### **1. Alat**

Gelas ukur, tabung reaksi, botol besar berwarna coklat (gelap), objek glass, timbangan analitik, oven, inkas, 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.

#### **2. Bahan**

Biji pinang, daun kelor, etanol 96% (Merck), siprofloksasin, DMSO 10%, hidrogen peroksida, larutan mayer, cakram disk antibiotik, kertas whatman nomor 1, larutan Dragendorff, larutan  $\text{FeCl}_3$  1%, asam asetat pekat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), aquades, asam sulfat pekat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), EA (*Endo Agar*), asam klorida pekat ( $\text{HCl}$ ), serbuk magnesium, amil alkohol, media *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Merck), bakteri *Escherichia coli*, NaCl 0,9%, media *nutrient agar* (NA), safranin, crystal violet, lugol, mayer, asam asetat anhidrat ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ ), Mcfarland 0.5, Nutrient Broth (NB), Burchard, reagent elrich A dan B, media agar SIM, KIA, LIA dan media sitrat.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Determinasi Bahan**

Sebelum dilakukan penelitian terlebih dahulu dilakukan identifikasi tanaman biji buah pinang (*Areca catechu* L.) dan daun kelor (*Moringa oleifera* L.). Determinasi ini dilakukan untuk memastikan keaslian sampel yang sesuai dengan ciri morfologi tanaman yang dilakukan di RSUP Dr. Sardjito

#### **2. Pengumpulan Bahan**

Buah pinang dan daun kelor diambil dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Buah pinang dari buah yang sudah matang

ditandai dengan kulit buah berwarna kuning kecoklatan serta konsistensi buah yang keras. Daun kelor dipetik secara acak dipisah daun yang tidak terlalu tua dan masih berwarna hijau, segar dan dalam kondisi bebas penyakit atau hama. Biji pinang dan daun kelor dicuci dibawah air mengalir sampai bersih yang ditunjukkan dengan hilangnya kotoran atau debu yang melekat.

### **3. Pembuatan Serbuk Biji Pinang dan Daun Kelor**

Biji pinang dan daun kelor segar di sortasi basah kemudian dicuci dan ditiriskan, dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50<sup>0</sup>C. Biji pinang dan daun kelor ditimbang, diserbuk dengan blender kemudian diayak dengan ayakan nomor 60 sehingga diperoleh serbuk simplisia yang memiliki derajat kehalusan yang relatif homogen. Hasil penyerbukan yang berupa serbuk kering disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat (Dewi *et al.*, 2023).

### **4. Pemeriksaan Organoleptik Serbuk Biji Pinang Dan Daun Kelor**

Pengujian organoleptik serbuk dilakukan untuk mengetahui karakteristik sensori seperti warna, bau, rasa, dan tekstur sebagai bentuk identifikasi dan kontrol mutu awal. Tujuan lainnya adalah mendeteksi indikasi kontaminasi, adulterasi, atau degradasi bahan serta memastikan konsistensi kualitas serbuk (Firdaus *et al.*, 2022). Penelitian ini mengidentifikasi organoleptik terhadap serbuk biji pinang dan daun kelor dengan cara melihat bentuk, bau dan warna serbuk masing-masing tanaman.

### **5. Penetapan Susut Pengeringan Serbuk Biji Pinang Dan Daun Kelor**

Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan dengan cara yang telah ditetapkan. Timbang 1 hingga 2 gram simplisia dalam botol timbang dangkal bertutup yang telah dipanaskan pada suhu penetapan sebelum ditara. Dengan menggoyangkan botol timbang, ratakan sampel dalam botol timbang hingga ada lapisan tebal kira-kira 5–10 mm. Kemudian, masukkan ke dalam pengering tutup botol dibuka dan keringkan pada suhu penetapan hingga bobotnya tetap. Sebelum pengeringan, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu ruang (Farmakope Herbal Indonesia edisi II, 2017).

### **6. Penetapan Kadar Air Serbuk Biji Pinang Dan Daun Kelor**

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluena. Toluena dijenuhkan dengan air. kemudian didiamkan hingga lapisan

toluena dan air memisah, lalu buang lapisan airnya. Melakukan penimbangan sebanyak 20 g ekstrak, kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan toluena yang telah jenuh. Kemudian melakukan pemasangan alat destilasi, dan toluen dituangkan dalam tabung penerima melalui pendingin. Labu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, penyulingan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes /detik. setelah toluen mendidih pendingin dicuci dengan toluen sambil disikat dengan sikat kecil. Sulingan berlanjut selama 5 menit, dibiarkan tabung penerima mendingin sampai suhu kamar. Setelah kedua lapisan memisah sempurna, dapat dilakukan analisa volume air dan kadar air dalam persen terhadap berat ekstrak semula (Farmakope Herbal Indonesia Edisi II ,2017).

### **7. Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Pinang dan Daun Kelor**

Ekstraksi dilakukan dengan cara serbuk biji pinang dan daun kelor ditimbang 500 gram ditambahkan etanol 96% sebanyak 5 liter direndam dan diikat kuat dengan aluminium foil. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Setelah 18 jam disaring menggunakan kain flanel, ampas diambil dan ditambah dengan etanol 96% sebanyak 2,5 bagian pelarut didiamkan selama 12 jam dan disaring lagi diulangi 3 kali. Hasil maserasi diuapkan dengan rotary evaporator hingga menghasilkan ekstrak kental biji pinang dan daun kelor (FHI II, 2017). Diaduk kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah 18 jam disaring menggunakan kain flanel, ampas diambil ditambah dengan etanol 96%, sebanyak 2,5 bagian pelarut didiamkan selama 12 jam dan disaring lagi diulang 3 kali. Hasil maserasi diuapkan dengan rotary evaporator hingga menghasilkan ekstrak kental biji pinang dan daun kelor (FHI II, 2027).

### **8. Penetapan Persen Rendemen Ekstrak**

Perhitungan persen rendemen bertujuan untuk mengetahui seberapa banyak ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi. Proses ini dilakukan dengan menimbang berat ekstrak yang diperoleh lalu dibagi dengan berat serbuk dan dikali 100%.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat serbuk}} \times 100\% \text{ (Depkes RI , 2000)}$$

### **9. Pemeriksaan Organoleptik Ekstrak Biji Pinang Dan Daun Kelor**

Uji organoleptik ekstrak dilakukan sebagai langkah awal untuk mengevaluasi mutu dan keaslian ekstrak berdasarkan warna, bau, dan konsistensi. Pengujian ini dilakukan untuk mendeteksi adanya

degradasi, kontaminasi serta memastikan konsistensi ekstrak (Upton *et al.*, 2020). Pada penelitian ini dilakukan identifikasi organoleptik terhadap ekstrak biji pinang dan daun kelor dengan cara melihat bentuk, bau dan warna ekstrak masing-masing tanaman.

## **10. Uji Bebas Etanol**

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara esterifikasi alkohol. Melalui ekstrak biji pinang dan ekstrak daun kelor ditambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat lalu dididihkan, jika tidak ada bau khas ester berarti tidak ada alkohol pada ekstrak biji pinang dan daun kelor. Tujuan pengujian bebas etanol adalah untuk melepaskan etanol dari ekstrak untuk menghasilkan ekstrak murni, selain itu pelarut etanol bersifat antibakteri dan antijamur sehingga dengan tidak adanya kandungan etanol tidak akan menyebabkan positif palsu pada pengujian (Kurniawati, 2015).

## **11. Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak**

**11.1 Identifikasi Senyawa Flavonoid.** Sampel sebanyak 0,5 gram dipanaskan dalam 100 mL air hingga mendidih selama 15 menit. Larutan disaring dan filtratnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan serbuk magnesium, asam klorida pekat, dan amil alkohol secukupnya. Campuran dikocok kuat hingga membentuk dua lapisan yang terpisah. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan munculnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol. Warna jingga hingga merah menunjukkan keberadaan flavon, warna merah hingga merah tua mengindikasikan flavonoid, sedangkan warna merah tua hingga magenta menunjukkan kemungkinan adanya senyawa antosianin (Robinson, 1995).

**11.2 Identifikasi Senyawa Alkaloid.** Sampel sebanyak 0,5 gram kemudian dimasukkan pada tabung reaksi tambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling, dipanaskan pada penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring, filtrat dimasukkan pada 2 tabung reaksi dengan volume setiap tabung 3 ml, kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi Burchard dan Meyer. positif yang dihasilkan yaitu endapan putih atau kuning untuk reagen mayer dan endapan merah atau jingga untuk reagen dragendorff (Reiza *et al.*, 2019).

**11.3 Identifikasi Saponin.** Dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak dari masing-masing sampel ke dalam 10 mL air suling panas, lalu dipanaskan menggunakan penangas air. Setelah itu, larutan dikocok secara kuat-kuat. Jika tidak terbentuk busa, maka hasilnya

negatif. Namun, apabila busa tetap ada setelah didiamkan selama 10 menit dan tidak menghilang setelah penambahan HCl 2N, maka hasilnya positif menunjukkan adanya kandungan saponin (Novriyanti *et al.*, 2022).

**11.4 Identifikasi Senyawa Tanin.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak yang telah dihaluskan ditambah 10 ml aquades dipanaskan dan disaring kemudian filtratnya diencerkan dengan aquades sampai tidak berwarna. Ambil 2 ml larutan 2-3 tetes  $\text{FeCl}_3$ . Terbentuknya warna biru atau hijau menunjukkan adanya tanin (Telaumbanua *et al.*, 2021).

**11.5 Identifikasi Senyawa Steroid/ Triterpenoid.** Dilakukan dengan menambahkan ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambahkan 2 ml kloroform dalam ekstrak dan tambahkan 10 tetes asam asetat anhidrat lalu meneteskan 3 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  melalui dinding tabung reaksi. Jika dalam sampel terdapat senyawa triterpenoid, maka campuran akan menunjukkan perubahan warna menjadi merah. Sementara itu, jika senyawa steroid ditandai dengan perubahan warna menjadi biru (Asworo *et al.*, 2023).

## **12. Sterilisasi Alat Dan Bahan Penelitian**

Alat dan media yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu, sterilisasi dilakukan agar menghindari pertumbuhan serta pencemaran dari mikroorganisme lainnya. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini dicuci terlebih dahulu, dikeringkan dan disterilkan menggunakan oven dengan suhu  $170-180^\circ\text{C}$  selama 1-2 jam. Kemudian pada media yang akan digunakan disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit (Azizah *et al.*, 2020).

## **13. Peremajaan Bakteri**

Peremajaan bakteri dilakukan dengan menggunakan metode ose gores. Biakan murni bakteri *Escherichia coli* diambil satu ose kemudian digoreskan pada permukaan medium Nutrient Agar (NA) miring secara aseptik kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 1x24 jam (Nurdahniyati *et al.*, 2019).

## **14. Pembuatan Suspensi Bakteri *Escherichia Coli***

Bakteri uji *Escherichia coli* ditampung pada media biakan murni Nutrient Agar (NA) pada temperatur  $37^\circ\text{C}$  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 campuran dibandingkan dengan kekeruhan Mc Farland 0,5 standar yang setara dengan 108 CFU/mL (Claudia *et al.*, 2021).

## **15. Identifikasi Bakteri *Escherichia Coli***

**15.1 Uji Media Selektif.** Kultur murni bakteri *Escherichia coli* diinokulasikan secara digoreskan pada media EA (*Endo Agar*) dengan media cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan mengamati pertumbuhan koloni yang tumbuh pada media EA. Pada media EA koloni bakteri *E. coli* berwarna merah atau logam mengkilat, hal ini dikarenakan kemampuan yang dimiliki oleh bakteri dalam memfermentasikan laktosa (Trisno *et al.*, 2019).

**15.2 Uji Pewarnaan Gram.** Dilakukan dengan mengambil satu ose koloni bakteri yang kemudian ditempatkan di atas kaca objek dan difiksasi menggunakan panas dari nyala lampu bunsen. Setelah preparat kering, ditetaskan larutan kristal violet (Gram A) sebanyak 2–3 tetes sebagai pewarna utama hingga seluruh area ulasan terwarnai, lalu didiamkan selama sekitar satu menit. Setelah itu, preparat dibilas menggunakan aquades dan ditetaskan larutan lugol (Gram B), kemudian didiamkan kembali selama kurang lebih satu menit. Preparat selanjutnya dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Proses dilanjutkan dengan penambahan peluntur Gram C (alkohol 96%) selama  $\pm 30$  detik, kemudian diwarnai ulang dengan larutan safranin (Gram D) selama sekitar dua menit. Setelah itu, preparat dibilas kembali dengan aquades, dikeringkan menggunakan tisu dengan cara menempelkan pada sisi kaca objek, lalu dibiarkan mengering sempurna. Preparat yang sudah siap kemudian diamati di bawah mikroskop untuk melihat morfologi bakteri. *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif yang berwarna merah berbentuk batang pendek dan tersusun menyerupai rantai (Trisno *et al.*, 2019).

**15.3 Identifikasi *Escherichia coli* dengan uji biokimia.** Identifikasi biokimia dilakukan dengan media SIM, KIA, LIA dan Sitrat.

**15.4 Media SIM (*Sulfida Indol Motility*).** Biakan bakteri ditambah reagen Erlich A dan B diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, kocok dan diamkan selama beberapa menit. Warna cherry merah pada permukaan cincin menunjukkan reaksi indol yang positif, sedangkan warna jingga menunjukkan reaksi indol yang negatif (Sari *et al.*, 2014).



**15.4.1 Media KIA (*Kliger's Iron Agar*).** Bakteri dimasukkan ke dalam media melalui tusukan dan goresan, media tersebut kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Ada tidaknya gas dan penampilan warna hitam pada media diamati pada dasar dan lereng tabung. Jika bakteri dapat memfermentasi glukosa dan laktosa pada bagian miring, media menjadi kuning (Prisnanda *et al.*, 2022).

**15.4.2 Media LIA (*Lysin Iron Agar*).** Biakan murni bakteri diinokulasi pada media dengan tusukan dan goresan Metode ini bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba penghasil enzim yang mampu memendek, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif bila terjadi perubahan warna pada media menjadi warna lembayung (violet) (Cappuccino dan Sherman, 1992).

**15.4.3 Media Sitrat.** Media murni bakteri diinokulasikan pada media dengan tusukan dan goresan selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Warna hijau menunjukkan hasil negatif (Safitri *et al.*, 2019).

## **16. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Dilusi**

Uji dilusi yang dilakukan pada biji pinang dan daun kelor untuk mengetahui KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). Metode dilusi menggunakan 10 tabung. Secara aseptis dibuat deret dengan konsentrasi Media BHI dimasukkan 0,5 ml pada setiap tabung kecuali tabung pertama. Tabung pertama diberi ekstrak sebanyak 1 ml kemudian 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 *Escherichia coli* sebanyak 0,5 ml pada tabung ke 2 sampai tabung ke 9. Persen konsentrasi yang digunakan yaitu 60%, 30%, 15%, 7,5%, 3,75%, 1,87%, 0,93%, 0,46% pada masing-masing tabung.

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 dengan cara digores goresan pada media selektif lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Inokulasi dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri dari *Escherichia coli*. 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).

### **17. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi (Kertas Cakram)**

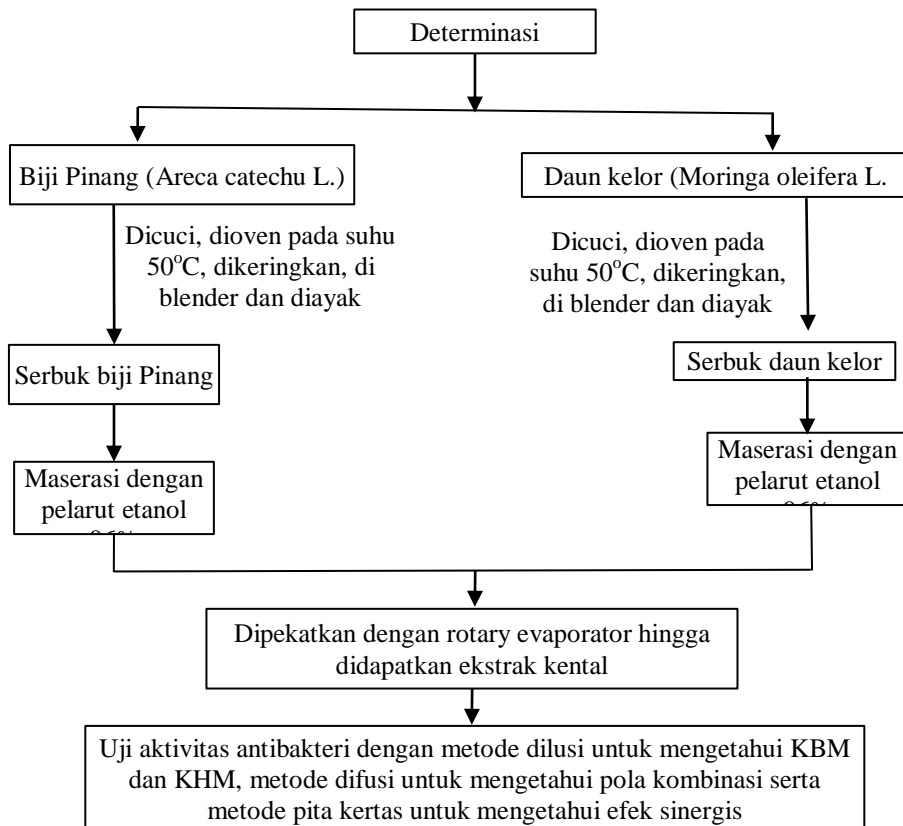
Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Pengujian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta. Cara pengujian dilakukan dengan cara memasukkan lidi steril ke dalam suspensi bakteri yang telah dibuat dan diinokulasikan (swab) ke media MHA dan didiamkan pada temperatur ruang (25°C) selama 10 menit untuk suspensi biakan berdifusi 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 diteteskan dengan mikropipet ke dalam kertas cakram dengan volume 20-200  $\mu\text{L}$  dengan ketelitian 0,1  $\mu\text{L}$ . 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 di sekitar cakram ditandai dengan adanya daerah bening atau jernih. Perbandingan ekstrak biji pinang dan daun kelor adalah (1:1), (1:2) dan (2:1). Adanya kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin, sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 10% (Yani *et al.*, 2024).

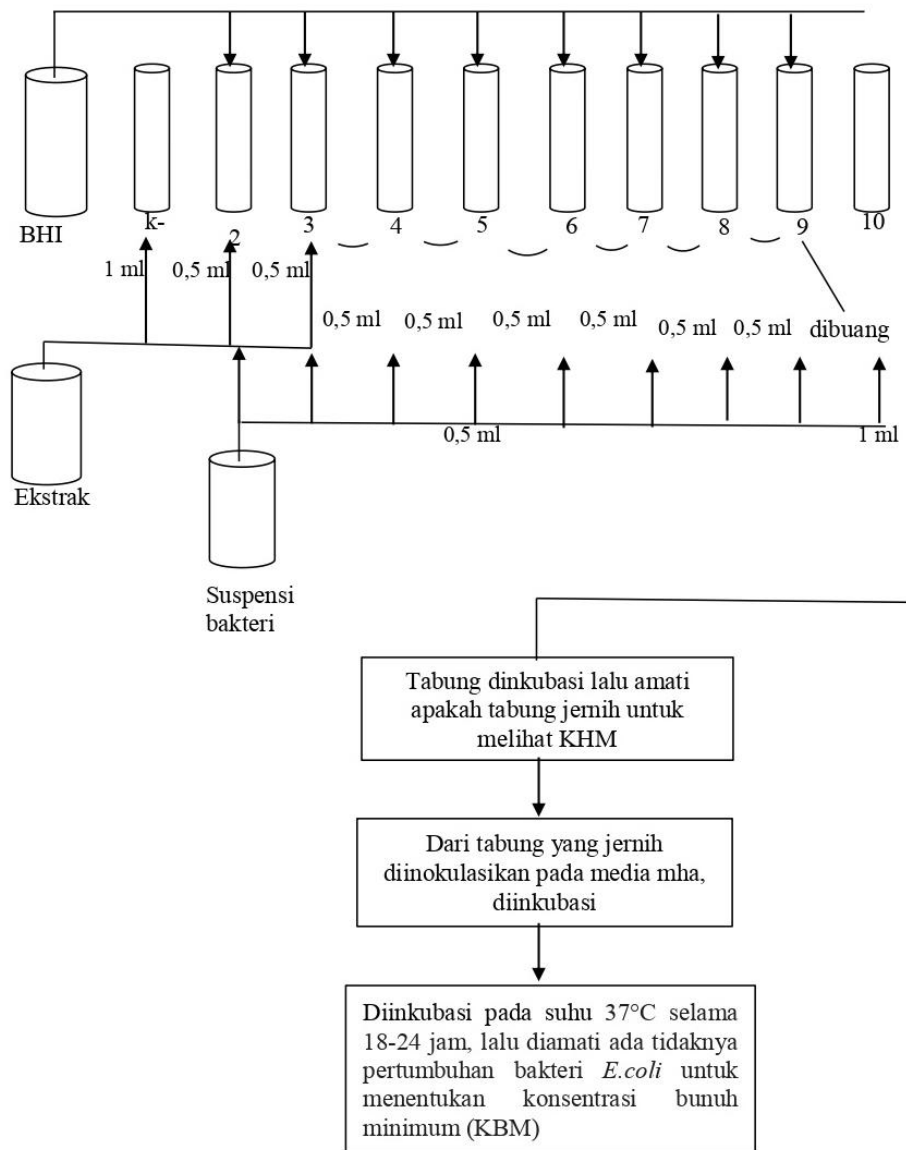
### **18. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Pita Kertas**

Pengujian pada metode ini yaitu pita kertas terbuat dari kertas Whatman nomor 1, berukuran 0,5 x 4 cm. Masing-masing larutan ekstrak dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 50 mililiter. Selanjutnya, permukaan kertas direndam hingga semuanya basah. Setelah kedua kertas direndam dan diangkat secara bersamaan menggunakan pinset. Kertas diletakkan tegak lurus dengan bagian-bagiannya saling tindih dalam sudut 90° pada media MHA yang telah dioleskan dengan bakteri *Escherichia coli*. Cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C efek kombinasi dikatakan bersifat sinergis jika adanya peningkatan zona hambat yang signifikan (lebih besar dari penjumlahan efek secara tunggal), efek antagonis jika terjadi pengecilan zona hambat pada sudut 90° pada pertemuan kedua pita kertas, sedangkan additive/indifferent ketika efek yang ditimbulkan saling tidak mempengaruhi satu sama lainnya (Hanifa *et al.*, 2022)

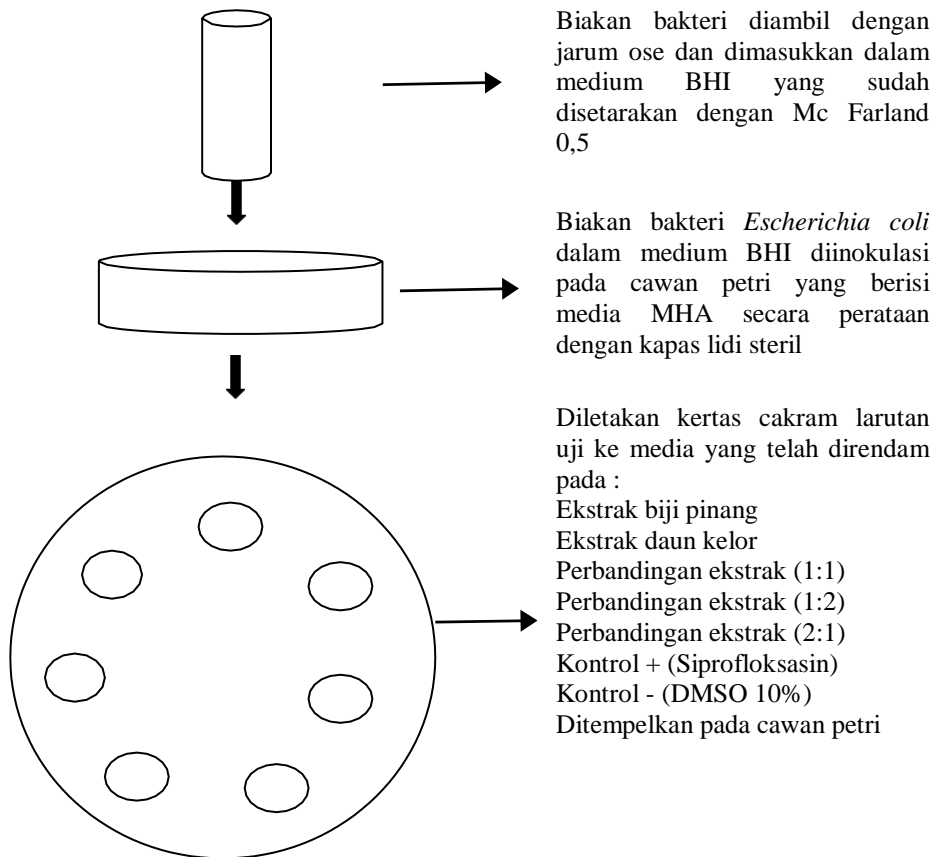
### **E. Analisis Hasil**

Data yang dihasilkan oleh metode pengujian aktivitas antibakteri adalah nilai zona hambat dari perbandingan kombinasi ekstrak etanol biji pinang dan daun kelor dalam satuan milimeter. Data yang dihasilkan dianalisis dengan menggunakan software SPSS 21 untuk memeriksa adanya data dapat berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan Saphiro wilk, jika data berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dilanjutkan dengan uji parametric (ANOVA), jika data tidak terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis. Nilai zona hambat dan zona bening yang didapatkan dari kontrol positif dan perlakuan pada bakteri yang sama.

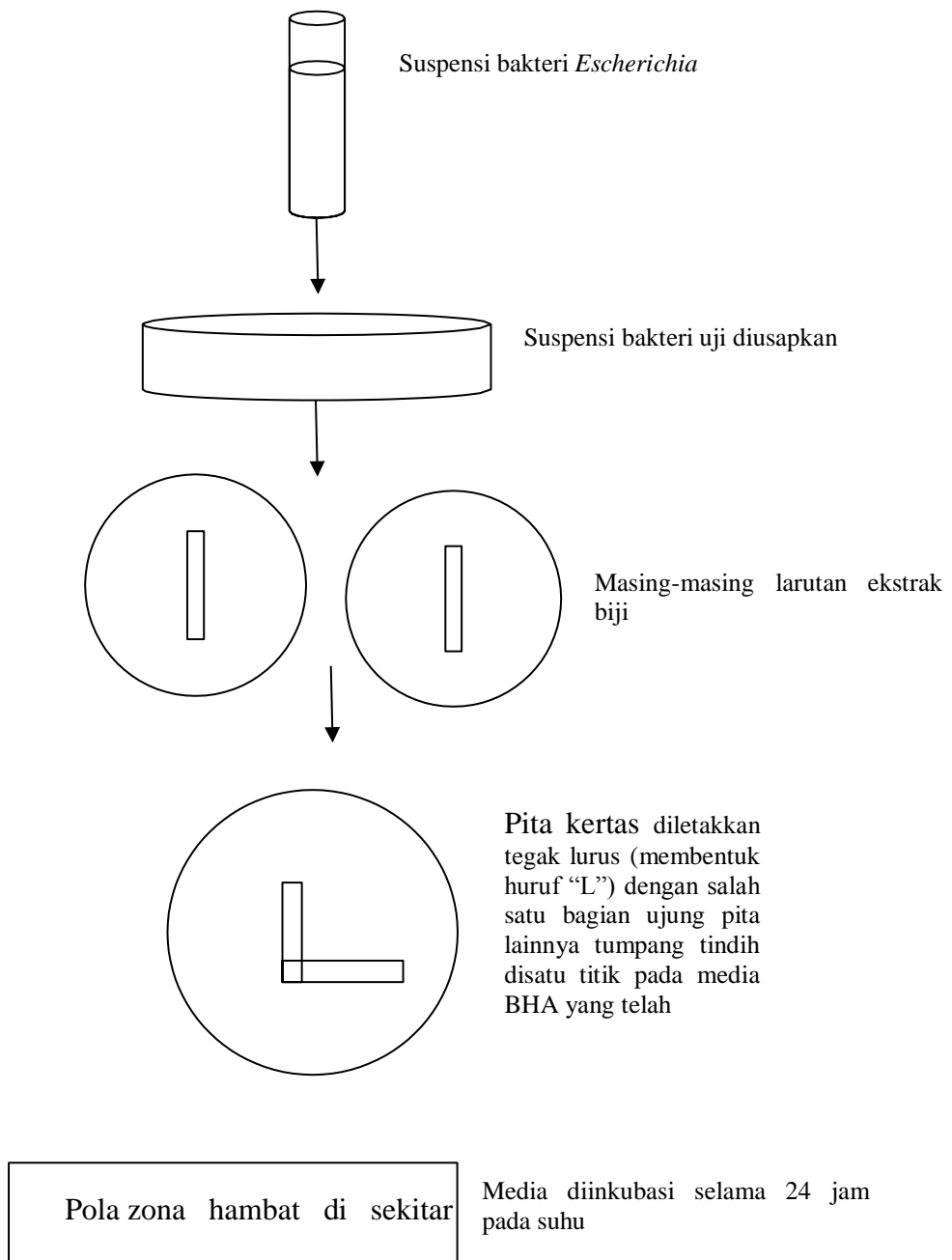
**F. Skema Penelitian****Gambar 5. Pembuatan ekstrak biji pinang dan daun kelor**



**Gambar 6. Skema uji antibakteri *Escherichia coli* secara dilusi**



**Gambar 7. Skema uji antibakteri *Escherichia coli* secara difusi**



**Gambar 8. Skema pengujian uji kombinasi dengan metode pita kertas**