

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental, yaitu dengan sampel ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Determinasi tanaman akan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).
2. Ekstraksi daun cengkeh dan uji aktivitas antibakteri akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo.
3. Waktu penelitian
Penelitian ini akan dilaksanakan mulai dari Bulan Oktober sampai Desember 2021.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) yang berasal dari Dusun Bapang, Kelurahan Harjosari, Kecamatan Bawen, Kabupaten Semarang.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) sebanyak 2 kg yang berasal dari Dusun Bapang, Kelurahan Harjosari, Kecamatan Bawen, Kabupaten Semarang.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini yaitu,

1. Metode Ekstraksi Maserasi

Metode ekstraksi maserasi merupakan metode paling mudah dan sederhana, cara melakukan maserasi yaitu dengan mencampurkan serbuk simplisia yang direndam dengan pelarut etanol 96% di dalam wadah yang tertutup rapat pada suhu kamar dan selama 3 hari.

2. Ekstrak Kasar Daun Cengkeh

Ekstrak kasar daun cengkeh adalah ekstrak yang didapatkan dari proses maserasi dengan pelarut etanol 96% kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi.

3. Ekstrak Terpurifikasi Daun Cengkeh

Ekstrak terpurifikasi daun cengkeh adalah ekstrak yang didapatkan dari ekstrak kasar daun cengkeh yang kemudian dilakukan purifikasi dengan n-heksan dengan corong pisah.

4. Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian ini, uji aktivitas antibakteri adalah uji yang akan dilakukan dengan sampel ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan

Staphylococcus aureus dengan hasilnya adalah terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak kasar daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dan 25%, ekstrak terpurifikasi daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dan 25%, kontrol positif ampisillin dan kontrol negatif aquadest.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah diameter zona hambat pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah alat, bahan, waktu inkubasi, suhu inkubasi, metode dan lama ekstraksi, jumlah pelarut dan jumlah sampel.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah wadah untuk maserasi, alat-alat gelas, autoklaf, *rotary evaporator*, pisau, blender, pipet tetes, mikro pipet, ayakan 40 mesh, *Laminar Air Flow*, batang pengaduk, jangka sorong, kawat ose, inkubator, oven, tabung

reaksi, rak tabung reaksi, pinset, lampu spiritus, gelas ukur, kertas saring, *blank disc* steril (kertas cakram steril), corong pisah, labu ukur, timbangan analitik, cawan petri, kertas hvs, cawan penguap, *waterbath*, mikroskop dan *object glass*.

b. Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah plastik wrap, *aluminium foil*, aquadest, aquadest steril, etanol 96%, n-heksan, medium *Nutrient Agar* (NA), bakteri *Escherichia coli*, bakteri *Staphylococcus aureus*, daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*), pereaksi dragendrof, pereaksi bouchardat, pereaksi mayer, serbuk Mg (magnesium), HCl pekat (asam klorida), CH₃COOH (asam asetat), pereaksi FeCl₃ (besi klorida), NaCl 0,9%, BaCl₂ (barium klorida), H₂SO₄ (asam sulfat), tablet ampicillin, DMSO (dimetilsulfoksida), cat gram A (kristal violet), cat gram B (lugol iodin), cat gram C (alkohol aseton) dan cat gram D (larutan safranin).

2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman digunakan untuk memastikan bahwa tanaman yang akan diteliti adalah benar daun cengkeh. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).

3. Pemanenan Daun Cengkeh

Pemanenan daun cengkeh ini dipanen di kebun cengkeh yang berada di daerah Dusun Bapang, Kelurahan Harjosari, Kecamatan Bawen, Kabupaten Semarang. Kriteria pemanenan daun cengkeh diambil pada daun ke 4-6 dari pucuk daun, daun yang dipilih yaitu daun yang memiliki ukuran yang sama, dan daun yang bebas dari penyakit, tidak berlubang dan bebas dari hama (Dewi, 2017). Setelah daun cengkeh dipanen kemudian dilakukan pembuatan simplisia daun cengkeh.

4. Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Cengkeh

Pembuatan serbuk simplisia daun cengkeh ini dimulai dari proses sortir basah yaitu 2 kg daun cengkeh yang masih segar, dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Daun cengkeh yang sudah dicuci bersih lalu dipotong-potong untuk mempermudah dalam pengeringan. Kemudian potongan daun cengkeh dikering anginkan dan terlindung dari sinar matahari langsung. Setelah daun cengkeh kering selanjutnya dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan nomor 40 mesh (Lumingkewas *et al.*, 2014).

5. Standarisasi Simplisia Parameter Non Spesifik

a. Uji Kadar Air Simplisia

Setelah simplisia kering, dilakukan uji kadar air. Timbang 2 gram serbuk simplisia, masukkan dalam cawan yang sudah ditimbang lalu masukkan dalam oven selama 3 jam dengan suhu

105°C. Keluarkan cawan berisi serbuk simplisia lalu dinginkan dan timbang kembali (Himawan *et al.*, 2018). Penghitungan kadar air digunakan rumus sebagai berikut:

$$Kadar\ air\ (\%) = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel setelah pemanasan (gram)

b. Uji Kadar Abu Simplisia

Uji kadar abu pada simplisia daun cengkeh dilakukan dengan cara memasukkan 2 gram serbuk simplisia daun cengkeh kedalam kurs porselin yang sebelumnya telah ditimbang. Ratakan permukaan serbuk simplisia yang ada dalam kurs porselin, kemudian panaskan dengan suhu 600°C selama 3 jam dengan alat *muffle furnace*. Lalu timbang sisa abu dan dihitung nilai kadar abu dengan rumus berikut ini: (Anggraeni, 2020).

$$Kadar\ abu\ (\%) = \frac{berat\ abu}{berat\ sampel\ awal} \times 100\%$$

6. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cengkeh

Ekstraksi daun cengkeh dibuat dengan menggunakan metode maserasi. Pembuatan ekstrak etanol daun cengkeh dimulai dengan menimbang 200 gram serbuk daun cengkeh kemudian dimasukkan ke dalam wadah beserta pelarut menggunakan etanol 96% sebanyak 1.000 mL atau dengan perbandingan 1:5, tutup rapat dan simpan diruangan

yang terhindar dari sinar matahari langsung (Lomboan *et al.*, 2021). Proses ekstraksi ini dilakukan selama 2x24 jam dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 750 mL dan remaserasi dilakukan selama 1x24 jam dengan menggunakan sisa pelarut etanol 96% sebanyak 250 mL. Proses maserasi dilakukan dengan sesekali dilakukan pengadukan, setelah proses maserasi selesai campuran tersebut disaring menggunakan kertas saring (Ramadhani *et al.*, 2020). Setelah itu filtrat dicampur kemudian diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan uapkan lagi di atas *waterbath* hingga didapatkan ekstrak kental (Dianasari *et al.*, 2020).

7. Pembuatan Ekstrak Purifikasi Daun Cengkeh

Ekstrak kental daun cengkeh yang telah didapatkan kemudian dilakukan proses selanjutnya yaitu purifikasi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan dua pelarut yang tidak saling bercampur yaitu etanol dan n-heksan. Ditimbang ekstrak kental daun cengkeh sebanyak 10 gram kemudian dilarutkan menggunakan etanol 96% sebanyak 100 mL atau dengan perbandingan 1:10, masukkan dalam corong pisah lalu tambahkan pelarut n-heksan sebanyak 100 mL perbandingan 1:1 (Mulangsri *et al.*, 2020).

Gojog corong pisah selama kurang lebih 5 menit, kemudian diamkan corong pisah hingga terdapat dua lapisan. Lapisan atas merupakan lapisan n-heksan dan lapisan bawah merupakan lapisan ekstrak etanol. Proses penggojokan dilakukan hingga beberapa kali sehingga

didapatkan larutan n-heksan yang berwarna jernih (Mulangsri *et al.*, 2020). Langkah selanjutnya adalah menguapkan bagian ekstrak etanol daun cengkeh menggunakan *waterbath* kemudian hitung nilai rendemennya dan uji bebas etanol pada ekstrak.

8. Perhitungan Nilai Rendemen Ekstrak

Perhitungan nilai rendemen dilakukan pada masing-masing ekstrak etanol dan ekstrak terpurifikasi daun cengkeh. Perhitungan nilai rendemen menggunakan rumus sebagai berikut: (Sayuti, 2017).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental (gram)}}{\text{Berat sampel awal (gram)}} \times 100\%$$

9. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan pada masing-masing ekstrak etanol dan ekstrak terpurifikasi daun cengkeh. Masukkan masing-masing ekstrak kental ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan dengan 5 tetes pereaksi asam sulfat (H_2SO_4) dan 2 mL pereaksi kalium dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Gojog dan amati pada perubahan warna ekstrak, ekstrak dikatakan telah bebas etanol bila warna tetap coklat dan tidak berubah warna menjadi hijau (Astutik *et al.*, 2021).

10. Standarisasi Ekstrak Parameter Spesifik

a. Pengamatan Organoleptik

Pengamatan organoleptik ini dilakukan pada ekstrak etanol dan ekstrak terpurifikasi daun cengkeh meliputi warna, aroma dan bentuk dari masing-masing ekstrak (Diantoro *et al.*, 2015).

b. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat pada ekstrak kasar daun cengkeh dan ekstrak terpurifikasi daun cengkeh dilakukan secara kualitatif meliputi uji flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid.

1) Skrining Fitokimia pada Ekstrak Kasar Daun Cengkeh

a) Uji Flavonoid

Timbang sebanyak 0,5 mL ekstrak kasar daun cengkeh lalu tambahkan serbuk Magnesium sebanyak 2 mg dan beri 3 tetes HCl pekat. Terbentuknya perubahan warna merah, kuning atau jingga menandakan adanya kandungan flavonoid (Purwati *et al.*, 2017)

b) Uji Tanin

Ekstrak kasar daun cengkeh ditimbang sebanyak 0,5 mL kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi FeCl_3 1%, adanya perubahan warna menjadi coklat kehijauan atau ungu kehitaman menandakan adanya kandungan tanin (J. Rohmah *et al.*, 2019).

c) Uji Saponin

Ekstrak kasar daun cengkeh ditimbang sebanyak 0,5 mL kemudian ditambahkan dengan 10 mL aquadest lalu panaskan di penangas air. Larutan tersebut dikocok kuat hingga terbentuknya busa yang stabil menandakan adanya kandungan saponin (Rohmah *et al.*, 2019).

d) Uji Alkaloid

Siapkan tiga tabung reaksi, kemudian timbang 1,5 mL ekstrak kasar daun cengkeh masukkan dalam masing-masing tabung. Kemudian pada tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer membentuk endapan putih menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Pada tabung kedua beri 3 tetes pereaksi bouchardat jika terdapat endapan coklat atau kehitaman menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Pada tabung ketiga tambahkan 3 tetes pereaksi dragendrof jika terdapat endapan jingga atau merah coklat menunjukkan adanya kandungan alkaloid (Syamsul *et al.*, 2016).

2) Skrining Fitokimia pada Ekstrak Terpurifikasi Daun Cengkeh

a) Uji Flavonoid

Timbang sebanyak 0,5 mL ekstrak terpurifikasi daun cengkeh lalu tambahkan serbuk Magnesium sebanyak 2 mg dan beri 3 tetes HCl pekat. Terbentuknya perubahan warna merah,

kuning atau jingga menandakan adanya kandungan flavonoid (Purwati *et al.*, 2017).

1) Uji Tanin

Ekstrak terpurifikasi daun cengkeh ditimbang sebanyak 0,5 mL kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi FeCl_3 1%, adanya perubahan warna menjadi coklat kehijauan atau ungu kehitaman menandakan adanya kandungan tanin (J. Rohmah *et al.*, 2019).

2) Uji Saponin

Ekstrak terpurifikasi daun cengkeh ditimbang sebanyak 0,5 mL kemudian ditambahkan dengan 10 mL aquadest lalu panaskan di penangas air. Larutan tersebut dikocok kuat hingga terbentuknya busa yang stabil menandakan adanya kandungan saponin (Rohmah *et al.*, 2019).

3) Uji Alkaloid

Siapkan tiga tabung reaksi, kemudian timbang 1,5 mL ekstrak terpurifikasi daun cengkeh masukkan dalam masing-masing tabung. Kemudian pada tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer membentuk endapan putih menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Pada tabung kedua beri 3 tetes pereaksi Bouchardat jika terdapat endapan coklat atau kehitaman menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Pada tabung ketiga tambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff jika terdapat endapan

jingga atau merah coklat menunjukkan adanya kandungan alkaloid (Syamsul *et al.*, 2016).

11. Identifikasi Bakteri

Pewarnaan gram pada bakteri ini dilakukan untuk memastikan bahwa yang digunakan untuk uji aktivitas bakteri ini adalah bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Langkah pertama yang dilakukan adalah membersihkan *object glass* menggunakan alkohol 96% lalu keringkan, setelah kering tambahkan aquadest sebanyak 1 tetes. Ambil masing-masing biakan bakteri menggunakan kawat ose steril dan oleskan secara merata di atas *object glass*. Lakukan fiksasi dengan cara melewatkan *object glass* yang telah diolesi bakteri tersebut diatas api bunsen hingga mengering.

Masing-masing *object glass* yang telah kering kemudian diberi zat warna kristal violet lalu diamkan selama 1 menit, kemudian bilas dengan aquadest dan keringkan menggunakan tisu. Tahap kedua, beri 1-2 tetes larutan lugol diamkan selama 1 menit, bilas menggunakan aquadest dan keringkan menggunakan tisu. Tahap ketiga, tetesi *object glass* yang telah kering menggunakan alkohol 96% selama 15 detik lalu bilas menggunakan aquadest. Tahap terakhir, beri 1 tetes larutan safranin dan diamkan selama 1 menit kemudian bilas menggunakan aquadest dan keringkan dengan tisu. Amati hasil pewarnaan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100x (Arimbi, 2017).

Setelah diamati dari pembesaran di mikroskop dicocokkan dengan literatur bahwa *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis dan lapisan lipopolisakarida yang tebal. Pada bakteri *Staphylococcus aureus* yang termasuk bakteri gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal serta lapisan lipopolisakarida yang tipis. Dimana lapisan peptidoglikan pada bakteri gram positif yang tebal maka mampu mempertahankan warna kristal violet sehingga menghasilkan warna ungu. Berbeda dengan lapisan lipopolisakarida pada bakteri gram negatif yang tidak tahan terhadap alkohol, sehingga warna kristal violet yang telah diberikan akan luntur. Dan hanya dapat mempertahankan warna safranin yang memberikan warna merah (Dicky & Apriliana, 2016).

12. Sterilisasi Alat

Pertama-tama cuci dahulu alat yang akan digunakan hingga bersih kemudian keringkan. Untuk alat non gelas disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C (Qomar *et al.*, 2018). Kemudian untuk alat-alat gelas dibungkus dahulu menggunakan kertas kemudian disterilkan menggunakan oven selama 1 jam dengan suhu 180°C (Misna & Khusnul, 2016).

13. Pembuatan Media

a. Pembuatan Media NA

Proses pembuatan NA, yaitu dengan menimbang bubuk NA sebanyak 5 gram kemudian ditambahkan aquades sebanyak 250 mL

dan homogenkan larutan NA hingga tercampur rata. Sterilisasi larutan NA tersebut di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan larutan lalu tuang kedalam cawan petri sebanyak 15 mL pada ruangan LAF dan biarkan padat didalam ruangan LAF (Qomar *et al.*, 2018).

b. Pembuatan Media Agar Miring

Pembuatan media agar miring ini dilakukan untuk menumbuhkan bakteri dalam tabung reaksi yang berisi NA agar yang telah padat, kemudian goreskan 1-2 ose kultur bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara zig-zag dari bawah ke atas pada media agar miring yang berbeda. Media agar miring yang telah selesai dibuat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam (Mahmudah & Atun, 2017).

c. Pembuatan Larutan Mc Farland 1

Pembuatan larutan Mc Farland 1 ini dengan cara menambahkan Barium Clorida ($BaCl_2$) 1% dan Asam Sulfat (H_2SO_4) 1%. Larutan Mc Farland 1 untuk memperoleh kekeruhan bakteri setara dengan $3,0 \times 10^8$ CFU/mL (Pajan *et al.*, 2016). Pembuatan dilakukan dengan cara mencampurkan kedua larutan pada labu ukur ukuran 10 mL, dengan perbandingan 0,1 ml $BaCl_2$ 1% dan 9,9 ml H_2SO_4 1% dan menyimpan larutan dalam ruangan LAF (Qomar *et al.*, 2018).

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara diambil sebanyak 3 ose masing-masing bakteri *Escherchia coli* dan *Staphylococcus aureus* dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologi 0,9%, lalu tabung reaksi dikocok sampai homogen. Kemudian disamakan dengan larutan standar Mc Farland, bila kekeruhan suspensi bakteri belum sama dengan kekeruhan larutan pembanding, maka diambil kembali bakteri menggunakan kawat ose (Misna & Khusnul, 2016).

e. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Ekstrak Kasar

Pembuatan konsentrasi larutan uji ekstrak kasar daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dari hasil ekstraksi maserasi yang telah dipekatkan dengan variasi konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% pengenceran konsentrasi dibuat menggunakan rumus: (Magani *et al.*, 2020).

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan :

M_1 = Konsentrasi awal

V_1 = Volume yang diperlukan

M_2 = Konsentrasi yang akan dibuat

V_2 = Volume yang akan dibuat

f. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Ekstrak Terpurifikasi

Pembuatan konsentrasi larutan uji ekstrak terpurifikasi daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dengan variasi konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% pengenceran konsentrasi dibuat menggunakan rumus: (Magani *et al.*, 2020).

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan:

M_1 = Konsentrasi awal

V_1 = Volume yang diperlukan

M_2 = Konsentrasi yang akan dibuat

V_2 = Volume yang akan dibuat

g. Pembuatan Larutan Uji Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Kontrol positif menggunakan tablet ampicillin 500 mg sebanyak 0,1 % yang dilarutkan dalam pelarut DMSO (Soemarie *et al.*, 2018). Siapkan aquadest steril yang digunakan untuk kontrol negatif.

1) Pembuatan Kontrol Positif Ampicillin 0,1 % :

Sediaan obat ampicillin 500 mg kemudian digerus (Adibi *et al.*, 2017). Lalu dibuat larutan stok dengan cara menimbang 50 mg dilarutkan 50 mL pelarut kemudian dibuat konsentrasi 0,1%.

$$= \frac{0,1 \text{ mL}}{100 \text{ mL pelarut}} \times 5 \text{ mL pengenceran} =$$

0,005 mL

Sehingga diambil 0,005 mL pada larutan stok ampicillin kemudian dicukupkan hingga 5 mL menggunakan pelarut DMSO.

2) Pembuatan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ini adalah aquadest steril dengan cara dipipet sebanyak 5 mL.

h. Perlakuan Pengujian

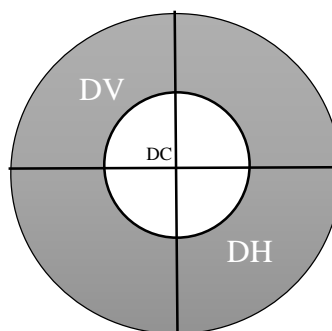
Media agar pada cawan petri yang telah memadat kemudian dioleskan suspensi bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara merata di permukaan NA menggunakan metode *spread plate* dengan kapas lidi steril. Tahap selanjutnya adalah merendam paper disk pada masing-masing konsentrasi ekstrak kasar daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*), ekstrak terpurifikasi daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*), kontrol positif dan kontrol negatif selama 15 menit (Sogandi & Rizky, 2018). Kemudian paper disk tersebut diletakkan di atas media agar yang telah diolesi bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan pengulangan sebanyak 3 kali (Mawan & Indriwati, 2018). Setelah itu cawan petri ditutup, kemudian panaskan sisi cawan diatas api bunsen dengan memutar-mutar agar cawan petri lebih steril. Tutup bagian tepi cawan petri menggunakan plastik wrap dan inkubasi pada suhu 37°C

selama 1x24 jam dengan posisi tutup cawan petri terbalik (Qomar *et al.*, 2018).

i. Pengamatan Hasil Aktivitas Antibakteri

Cawan petri yang telah diinkubasi selama 1x24 jam lalu diukur aktivitas antibakterinya. Letakan cawan petri secara berurutan di atas meja sesuai dengan perlakuan konsentrasinya. Letakan dalam posisi terbalik agar tutup cawan petri tidak mudah terbuka. Ukur diameter zona bening yang terbentuk pada masing-masing perlakuan dengan menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (Qomar *et al.*, 2018). Kemudian data dikategorikan berdasar panjang zona hambatnya, pengukuran zona bening menggunakan rumus sebagai berikut: (Wenda *et al.*, 2017)

$$\frac{(DV - DC) + (DH - DC)}{2}$$



Gambar 3. 1 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Keterangan :

DV : Diameter vertikal

DC : Diameter cakram

DH : Diameter horizontal



: Zona hambat

G. Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi daun cengkeh kemudian dianalisis menggunakan program SPSS dan didapatkan hasil sebagai berikut, langkah pertama yakni melakukan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak (Anderha & Maskar, 2021). Uji normalitas dalam penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dikarenakan data yang digunakan kurang dari 50 yaitu 3 kali replikasi dengan taraf uji signifikansi 5% atau 0,05 (Sabilillah et al., 2016). Bila signifikansi pada p-value hasilnya $<0,05$ maka H_0 ditolak begitu sebaliknya bila hasil p-value $>0,05$ atau sama dengan 0,05 maka H_0 diterima (Gaspersz & Salamor, 2021). Bila pada pengujian parametrik normalitas didapatkan hasil yang tidak normal maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu *Kolmogorov-Smirnov* dengan taraf signifikan uji 5% atau 0,05 dan nilai p-value $<0,05$ maka H_0 ditolak (Quraisy, 2020).

Hasil uji normalitas ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi terhadap bakteri *Escherichia coli* didapatkan salah satu perlakuan memiliki nilai signifikansi $<0,05$ pada konsentrasi 15% ekstrak kasar yaitu nilai signifikansi 0,044 dan konsentrasi 25% ekstrak terpurifikasi yaitu nilai signifikansi 0,017 sehingga data tersebut belum dikatakan terdistribusi normal sehingga dilakukan uji non parametrik menggunakan uji

Kolmogorov Smirnov. Dari hasil pengujian non parametrik *Kolmogorov Smirnov* ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi terhadap bakteri *Escherchia coli* didapatkan nilai Asymp. Sig. (2-tailed) <0,05 yaitu 0,008 dan 0,012 maka H0 ditolak dan menerima H1 yaitu terdapat perbedaan secara signifikan pada kelompok perlakuan terhadap zona hambat. Hasil uji normalitas ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan semua hasil signifikansi pada ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi memiliki nilai signifikansi p-value >0,05 sehingga H0 diterima yaitu data perlakuan telah terdistribusi normal.

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data yang digunakan dalam analisis telah homogen atau tidak. Uji homogenitas ini dilakukan menggunakan uji *Levene*, jika *p-value* menunjukkan hasil <0,05 maka H0 ditolak atau data tidak terdistribusi homogen (Rosidah *et al.*, 2014). Uji homogenitas didapatkan hasil yang tidak homogen selanjutnya dilakukan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Bila nilai p-value pada pengujian *Kruskal Wallis* didapatkan hasil *p-value* <0,05 kelompok penelitian memiliki perbedaan yang bermakna atau menerima H1 (Rosidah *et al.*, 2014). Analisis lanjutan dari uji non parametrik *Kruskal Wallis* ini adalah *Mann Whitney* untuk mengetahui pasangan nilai yang berbeda signifikan (Fiyanza *et al.*, 2017). Kriteria keputusan pada uji *Mann Whitney* ini jika nilai Asymp. Sig. >0,05 maka H0 diterima dan jika nilai Asymp. Sig. <0,05 maka H0 ditolak (Mubarok *et al.*, 2021)

Hasil uji homogenitas pada ekstrak kasar terhadap bakteri *Escherichia coli* didapatkan hasil tidak homogen yaitu nilai signifikansi 0,002 ($p\text{-value} < 0,05$) maka H_0 ditolak atau data tidak terdistribusi homogen sehingga harus dilakukan uji lanjutan non parametrik *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Kemudian pada hasil uji homogenitas pada ekstrak terpurifikasi terhadap bakteri *Escherichia coli* didapatkan hasil yang telah homogen yaitu nilai signifikansi 0,090 ($p\text{-value} > 0,05$) atau data telah terdistribusi homogen.

Pada uji *Kruskal Wallis* pada ekstrak kasar terhadap bakteri *Escherichia coli* didapatkan hasil *Asymp. Sig* 0,004 ($< 0,05$) maka perlakuan konsentrasi memiliki perbedaan yang bermakna terhadap zona hambat atau hipotesis menerima H_1 karena adanya perbedaan bermakna maka dilanjutkan uji *Mann Whitney*. Hasil uji *Mann Whitney* untuk melihat perbedaan antara 2 kelompok, hasil $p\text{-value} > 0,05$ maka tidak terdapat perbedaan dan hasil $p\text{-value} < 0,05$ maka terdapat perbedaan. Pada perbandingan konsentrasi ekstrak kasar antara 5% dengan 10%, 15% dengan 20%, 20% dengan 15%, 20% dengan 25%, 25% dengan 20% menunjukkan tidak ada perbedaan secara nyata dikarenakan hasil $p\text{-value} > 0,05$.

Hasil uji homogenitas pada ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan hasil yang berbeda. Pada ekstrak kasar nilai signifikansi yang didapatkan 0,059 ($p\text{-value} > 0,05$) maka H_0 diterima atau data telah terdistribusi homogen. Kemudian pada

ekstrak terpurifikasi nilai signifikansi yang didapatkan 0,035 (p -value $<0,05$) maka menolak H_0 atau data tidak terdistribusi secara homogen. Dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal Wallis* pada ekstrak terpurifikasi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil yang didapatkan pada nilai Asymp. Sig 0,006 (p -value $<0,05$) maka kelompok penelitian memiliki perbedaan yang bermakna terhadap zona hambat atau menerima H_1 . Hasil uji *Mann Whitney* untuk melihat perbedaan antara 2 kelompok, hasil p -value $>0,05$ maka tidak terdapat perbedaan dan hasil p -value $<0,05$ maka terdapat perbedaan. Pada perbandingan konsentrasi ekstrak terpurifikasi antara 5% dengan 10%, 5% dengan 15%, 10% dengan 5%, 10% dengan 15%, 10% dengan 20%, 15% dengan 5%, 15% dengan 10%, 15% dengan 20%, 20% dengan 10%, dan 20% dengan 15% menunjukkan tidak ada perbedaan secara nyata dikarenakan hasil p -value $>0,05$

Untuk uji akhir analisis dilakukan dengan uji *T-Test*, uji ini menggunakan satu objek penelitian dengan menggunakan dua atau lebih perlakuan yang berbeda (Hastuti, 2012) atau dua data berpasangan. Uji ini dilakukan untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna antara sampel ekstrak kasar dengan sampel ekstrak terpurifikasi (Patar et al., 2015). Dengan hipotesis nilai p -value $>0,05$ maka menerima H_0 atau tidak ada perbedaan yang bermakna.

Untuk uji akhir dilakukan uji *T-Test* antara ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi terhadap bakteri *Escherichia coli*. Diperoleh hasil Sig. (2-tailed) $>0,05$ yaitu 0,367 maka menerima H_0 dan menolak H_1 atau tidak

ada perbedaan yang bermakna. Uji aktivitas antibakteri pada beberapa perlakuan konsentrasi ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi terhadap bakteri *Escherichia coli* tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Hal tersebut dapat terjadi karena pada rata-rata konsentrasi ekstrak kasar 15% (12,92 mm) dan 20% (13,27 mm) dengan rata-rata konsentrasi ekstrak terpurifikasi 15% (12,00 mm) dan 20% (12,29 mm) terjadi penurunan pada ekstrak terpurifikasi.

Untuk uji akhir dilakukan uji *T-Test* antara ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Diperoleh hasil Sig. (2-tailed) <0,05 yaitu 0,002 maka menolak H₀ dan menerima H₁ atau terdapat perbedaan yang bermakna. Uji aktivitas antibakteri pada beberapa perlakuan konsentrasi ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat perbedaan yang bermakna terhadap zona hambat.