

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Metode penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental, daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan daun pepaya (*Papaya carica* L) diekstraksi dengan metode maserasi yaitu menggunakan pelarut etanol 96 %, Kemudian hasil dari ekstrak akan diuji aktivitasnya terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* ekstrak tunggal dan kombinasi ekstrak. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi cakram, dimana dalam teknik ini media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri kemudian dimasukan kertas cakram dalam media dan diisi dengan senyawa uji.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### 1. Lokasi Penelitian

- a. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).
- b. Ekstraksi daun cengkeh dan daun pepaya dan skrining metabolit sekunder dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Uji aktivitas antibakteri dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo.

## 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari bulan Juni sampai Juli 2023.

## C. Subjek Penelitian

### 1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan daun pepaya (*Carica papaya* L) yang berasal dari Kelurahan Polosiri, Kecamatan Bawen, Kabupaten Semarang, Provinsi Jawa Tengah.

### 2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) yang sudah tua berwarna hijau tua mengkilap, dan daun pepaya (*Carica papaya* L) yang sudah tua memiliki warna hijau pekat, masing-masing sebanyak 3 kg yang berasal dari Kelurahan Polosiri, Kecamatan Bawen, Kabupaten Semarang, Provinsi Jawa Tengah.

## D. Definisi operasional

### 1. Metode Ekstraksi Maserasi

Metode ekstraksi maserasi merupakan metode ekstrak dingin dengan mencampurkan serbuk simplisia yang direndam dengan pelarut etanol 96% di dalam wadah yang tertutup rapat pada suhu kamar, selama 3 hari dan terhindar dari sinar matahari secara langsung.

### 2. Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) .

Ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) adalah ekstrak yang didapatkan dari tanaman menggunakan metode maserasi 5 hari

menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan pelarut 1:5 kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi menggunakan rotary evaporator menggunakan suhu 40-60 °C.

### 3. Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L)

Ekstrak daun pepaya (*Carica papaya*) adalah ekstrak yang didapatkan dari tanaman menggunakan metode maserasi 5 hari menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:5 kemudian dilanjutkan pada proses evaporasi menggunakan rotary evaporator menggunakan suhu 40-60 °C.

### 4. Kombinasi Ekstrak Daun Cengkeh dan Pepaya Kombinasi Yang Digunakan

Kombinasi ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan pepaya (*Carica papaya*) yang digunakan, perbandingan 1:1 (ekstrak daun cengkeh : daun pepaya), 1:2 (ekstrak daun cengkeh : daun pepaya), dan 2:1 (ekstrak daun cengkeh : daun pepaya),

### 5. Etanol 96%

Etanol 96% adalah senyawa polar yang mudah menguap sehingga baik digunakan sebagai pelarut ekstrak.

### 6. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri adalah uji yang dilakukan dengan sampel ekstrak tunggal dan kombinasi daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan pepaya (*Carica papaya* L) terhadap bakteri *Staphylococcus*

*epidermidis* menggunakan metode difusi cakram dan hasilnya terbentuk zona hambat.

## **E. Variabel Penelitian**

### **1. Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu ekstrak tunggal dan kombinasi daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan pepaya (*Carica papaya* L) dengan perbandingan ekstrak (1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 2:1) dengan konsentrasi 5 %, 10 %, 15 %, dan 20 % dan dengan menggunakan pelarut yaitu etanol 96 %.

### **2. Variabel Tergantung**

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah uji diameter zona hambat ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L ) dan pepaya (*Carica papaya* L) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

### **3. Variabel Terkendali**

Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu simplisia, suhu, pelarut yang digunakan, media pertumbuhan, lama inkubasi, metode pengujian antibakteri, sterilisasi.

## **F. Alat dan Bahan**

### **1. Alat Penelitian**

#### **a. Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi Seperangkat alat meserasi (toples kaca), Nampan, Oven (Mommert UN-30), Ayakan 40 mesh, Blender (Vaganza), Tabung reaksi (Iwaki), Pipet

tetes, Alat-alat gelas (Pyrex/Iwaki), Rak tabung reaksi (Pyrex,Iwaki), Pinset, Lampu spiritus, Gelas ukur (iwaki), Kain flannel, Kertas cakram steril / *Blank disc steril*(Oxioid), Corong kaca, Labu ukur (iwaki), Timbangan analitik (Ohaus), Gunting, *Hot plate*, Cawan petri, Cawan penguap, Kertas hvs, Batang pengaduk, Jangka sorong, Mikroskop (Boeco), Mikropipet, Pipet ukur 1 ml, Sudip, Kaca arloji, Mortir dan stamper, Inkubator (Memmert), *Rotary evaporator* (RE200-PRO), *Beaker glass* 250 ml (Pyrex), Erlenmeyer 250 ml (Pyrex/Iwaki), Autoklaf (Hiramaya), LAF (Laminar Air Flow) (Airtech), *Water bath* (Anametri DHH-8), Kawat ose, *Cotton ball* / kapas steril (*Meoisorf*), Kasa steril (Kifamed).

#### **b. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, aquadest steril, etanol 96%, etanol 70%, medium Nutrient Agar (NA), pereaksi dragendorf, pereaksi mayer, serbuk Mg (magnesium), HCl pekat (asam klorida), plastik wrap, alumunium foil, pereaksi FeCl<sub>3</sub> (besi klorida), NaCl 0,9%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (asam sulfat), K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (kalium dikromat), doksisisiklin, cat gram A (kristal violet), cat gram B (lugol iodin), cat gram C (alkohol aseton) dan cat gram D (larutan safranin), bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus epidermidis*.

## **G. Prosedur Kerja**

### **1. Determinasi Tanaman**

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

### **2. Pemanenan Daun Cengkeh dan Daun Pepaya**

Pemanenan daun cengkeh dan pepaya dipanen Kelurahan Polosiri, Kecamatan Bawen, Kabupaten Semarang, Provinsi Jawa Tengah. Daun cengkeh yang digunakan adalah daun yang tua, tidak berlubang dan bebas dari hama (Dewi, 2017), sedangkan untuk daun pepaya dilakukan pemanenan daun yang diambil daun pepaya tua yang segar dan masih berwarna hijau. Setelah daun cengkeh dan daun pepaya dipanen, kemudian dilakukan pembuatan simplisia daun cengkeh dan pepaya (Sudarwati, 2018).

### **3. Pembuatan Simplisia Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L ) Dan Daun Papaya (*Carica papaya* L)**

Pembuatan serbuk simplisia daun cengkeh dan pepaya yang telah diperoleh masing-masing 3 kg selanjutnya, dilakukan sortasi basah terhadap bahan uji untuk memisahkan kotoran atau bahan-bahan asing. Sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji kemudian dicuci dengan air mengalir, selanjutnya daun cengkeh

dan daun pepaya yang sudah dicuci bersih lalu dilakukan proses pemotongan untuk mempermudah dalam pengeringan. Kemudian potongan daun cengkeh dan daun pepaya dikeringkan menggunakan dengan sinar matahari secara tidak langsung dengan ditutup menggunakan kain hitam. Daun cengkeh dan pepaya yang sudah kering, dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus kemudian diayak dengan ayakan No 40 mesh (Wijaya & Noviana 2020).

#### 4. Standarisasi Simplisia Parameter Non Spesifik

##### a. Uji Kadar Air Simplisia

Uji kadar air pada simplisia jika simplisia sudah kering, dilakukan uji kadar air pada simplisia, yaitu dengan cara menimbang cawan porselin ditara selanjutnya dilakukan menimbang 2 gram masing-masing serbuk simplisia, dimasukkan ke dalam oven selama 3 jam dengan suhu 105°C. Selanjutnya keluarkan cawan yang berisi simplisia lalu didinginkan dengan desikator selama 20 menit dan timbang kembali bobotnya (Himawan *et al.*, 2018).

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

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 dan daun pepaya masing-masing dilakukan dengan cara memasukkan 2 gram serbuk simplisia daun cengkeh dan daun papaya kedalam kurs porselin kemudian 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 sampai bobotnya hingga konstan sisa abu dan dihitung nilai kadar abu dengan rumus berikut ini: (Anggraeni, 2020).

$$\text{Kadar abu total (\%)} = \frac{\text{Berat abu}}{\text{Berat sampel awal}} \times 100 \%$$

Keterangan:

**Berat abu** = Berat cawan dan sampel setelah pengeringan – berat cawan kosong.

**Berat sampel awal** = Berat cawan dan sampel sebelum pengeringan – berat cawan kosong.

### 5. Pembuatan Ekstrak Daun Cengkeh Dan Daun Pepaya

Ekstraksi daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan daun pepaya (*Carica papaya* L) menggunakan metode maserasi. Langkah pertama, dimulai dengan menimbang masing-masing 300 gram serbuk simplisia daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan daun pepaya (*Carica papaya* L) dimasukkan kedalam masing-masing ke bejana tertutup (toples kaca), kemudian dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96 % sebanyak 1.500 mL atau dengan menggunakan perbandingan 1 : 5 sampai serbuk terendam, tutup rapat (toples kaca). Maserasi dilakukan selama 5

hari pada ruangan yang terlindungi dari sinar matahari dan diaduk 3-4 kali dalam sehari, kemudian setelah 5 hari dilakukan penyaringan untuk mendapatkan fitrat menggunakan kain flanel (Lomboan *et al.*, 2021).

Hasil residu di remaserasi dengan pelarut etanol 96 % sebanyak 900 mL (1:3) selama 2 hari (Ramadhani *et al.*, 2020). Hasil maserat pertama dan maserat kedua dikumpulkan, diperoleh filtrat berupa daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan daun pepaya (*Carica papaya* L) maserat dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 40-60 °C hingga diperoleh ekstrak semi kental, kemudian uapkan di atas *waterbath* dengan suhu yang sama hingga diperoleh ekstrak kental dari daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan daun pepaya (*Carica papaya* L) (Adiningsih *et al.*, 2021).

## 6. Perhitungan Nilai Rendemen Ekstrak

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

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (gram)}}{\text{Bobot sampel awal (gram)}} \times 100\%$$

## 7. Uji Kadar Air Pada Ekstrak

Ekstrak daun cengkeh dan daun pepaya ditimbang masing-masing 2 g menggunakan neraca analitik kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105 °C selama 3 jam. Kemudian sampel didinginkan didalam desikator selama 20 menit dan ditimbang bobotnya (Kusmiati *et*

*al.*, 2019). Syarat kadar air pada ekstrak yang ditetapkan untuk menjaga mutu ekstrak adalah  $\leq 10\%$  (Wijaya & Novema, 2022).

## 8. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan memasukkan masing-masing ekstrak kental daun cengkeh dan daun pepaya ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan dengan 5 tetes pereaksi asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Fazri *et al.* 2019) 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).

## 9. Standarisasi Spesifik Pada Ekstrak

### a. Pengamatan Organoleptik

Dalam pengamatan organoleptik pengujian dengan menggunakan panca indera sebagai alat untuk mendeskripsikan bentuk, warna, dan bau dari ekstrak daun cengkeh dan daun pepaya (Aprilia *et al.*, 2021).

### b. Skrining fitokimia

Uji fitokimia pada ekstrak dan cengkeh dan daun pepaya adalah sebagai berikut:

#### 1) Uji Flavonoid.

Timbang sebanyak 10 mg masing-masing ekstrak dan cengkeh dan daun pepaya lalu tambahkan serbuk Magnesium sebanyak 2 mg dan beri 3 tetes HCl pekat. Terbentuknya

perubahan warna merah, kuning atau jingga menandakan adanya kandungan flavonoid ( Ramadhani & Novema, 2022).

#### 2) Uji Saponin

Ekstrak daun cengkeh dan daun pepaya masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg, ditambahkan 20 mL air panas. Selanjutnya di kocok kuat selama 10 detik, akan terbentuk buih yang stabil, dan tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Ramadhani *et al.*,2019).

#### 3) Uji Tanin

Ekstrak daun cengkeh dan daun pepaya ditimbang masing-masing sebanyak 10 mg kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1 %, adanya perubahan warna menjadi coklat kehijauan atau ungu kehitaman menandakan adanya kandungan tanin (Rohmah *et al.*, 2019).

#### 4) Uji Alkaloid

Siapkan enam tabung reaksi, kemudian masukkan 10 mg ekstrak daun cengkeh dan daun pepaya dalam masing-masing tabung. Lalu ditambahkan 10 mL kloroform diaduk rata. Kemudian ditambahkan 1 mL HCl 2N dan dikocok, dibiarkan beberapa saat. 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).

## 10. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan pewarnaan gram pada bakteri dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan untuk uji aktivitas bakteri merupakan bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Langkah pertama yang dilakukan *object glass* menggunakan alkohol 70% kemudian dikeringkan, tahap selanjutnya ambil biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* pada agar miring menggunakan jarum ose steril dan dioleskan secara merata di atas kaca objek. Kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewati *object glass* yang sudah diolesi bakteri di atas api bunsen hingga mengering (Novema & Ramadhani, 2022). Pada *objek glass* yang sudah kering ditetesi larutan kristal violet dan dibiarkan selama satu menit, kemudian bilas menggunakan aquadest dan keringkan dengan tisu. Tahap kedua, beri 1-2 tetes larutan lugol didiamkan selama satu menit, bilas dengan aquadest dan keringkan dengan tisu, tahap tiga, kaca obyek ditetesi larutan pemucat warna, yaitu larutan alkohol 70% didiamkan selama 15 detik, bilas menggunakan aquadest dan keringkan dengan tisu (Rahayu & Gumilar, 2017). Amati hasil pewarnaan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 x (Arimbi, 2017).

## 11. Sterilisasi Alat

Tahap pertama dilakukan pencuci terlebih dahulu alat yang akan digunakan sampai bersih kemudian dikeringkan. Alat non gelas disterilkan menggunakan autoklaf yang dilengkapi dengan katup pengaman selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Sedangkan alat-alat gelas dibungkus terlebih dahulu sebelum disterilkan menggunakan oven selama 1-2 jam dengan menggunakan suhu 180 °C (Azizah *et al.*, 2020).

## 12. Pembuatan Media

### a. Pembuatan Media NA

Larutkan 5 gram dalam 250 ml air demineralisasi dengan memanaskan dalam penangas air mendidih atau dalam aliran uap dan tartar dalam autoklaf (15 menit pada suhu 121 °C).

### b. Inokulasi Bakteri

Inokulasi bakteri tahap pertama dengan mengambil sebanyak 1 ose bakteri *Staphylococcus epidermidis* diambil menggunakan jarum ose bundar dan selanjutnya bakteri digoreskan rapat pada media Nutrient Agar (NA) miring secara zig-zag dari bawah sampai atas, kemudian biakan diinkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam (Kurama *et al.*, 2020).

### c. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara diambil sebanyak 3 ose masing-masing bakteri *Staphylococcus epidermidis* 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 0,5 . Jika kekeruhan suspensi bakteri belum sama dengan kekeruhan larutan pembanding, maka diambil kembali bakteri menggunakan kawat ose hingga sampai kekeruhan yang sama (Novema & Ramadhani, 2022).

d. Pembuatan Larutan Induk Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Cengkeh Dan Pepaya

Larutan uji ekstrak daun cengkeh dan pepaya dengan perbandingan yaitu : (1:0), (0:1), (1:1), (1:2), dan (2:1). Pada perbandingan (1:0) diambil ekstrak daun pepaya 8 mg, pada perbandingan (0:1) diambil ekstrak daun cengkeh 8 mg, pada perbandingan (1:1) diambil ekstrak daun pepaya 4 mg ditambahkan ekstrak daun cengkeh 4 mg, pada perbandingan (2:1) diambil ekstrak daun pepaya 5,3 mg ditambahkan ekstrak daun cengkeh 2,7 mg, pada perbandingan (2:1) diambil ekstrak daun cengkeh 5,3 mg ditambahkan ekstrak daun pepaya 2,7 mg.

e. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Ekstrak Daun Cengkeh Dan Pepaya

Pembuatan konsentrasi larutan uji ekstrak daun cengkeh dan pepaya dengan menggunakan variasi konsentrasi 5 %, 10%, 15 % dan 20 %. Pembuatan konsentrasi dengan menimbang ekstrak dengan rumus sebagai berikut : (Magani *et al.*, 2020).

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan: M1 = Konsentrasi awal

$V_1$  = Volume yang diperlukan

$M_2$  = Konsentrasi yang akan dibuat

$V_2$  = Volume yang akan dibuat

Masing-masing perbandingan ekstrak dibuat larutan induk dengan konsentrasi 80%, kemudian dibuat konsentrasi 5%,10%,15%, dan 20%. Pada konsentrasi 5% ekstrak tunggal daun cengkeh dan pepaya serta ekstrak kombinasi daun cengkeh dan daun pepaya, Konsentrasi 5% diambil dari masing-masing larutan induk sebanyak 0,31 ml, kemudian diencerkan dengan aquadest steril 5ml. Pada konsentrasi 10% ekstrak tunggal daun cengkeh dan pepaya serta ekstrak kombinasi daun cengkeh dan pepaya, diambil dari masing-masing larutan induk sebanyak 0,62ml, diencerkan dengan aquadest steril 5ml.

Pada konsentrasi 15% ekstrak ekstrak tunggal daun cengkeh dan pepaya serta ekstrak kombinasi daun cengkeh dan daun pepaya, diambil dari masing-masing larutan induk sebanyak 0,93 ml, kemudian diencerkan dengan aquadest steril 5ml. Pada konsentrasi 20% ekstrak ekstrak tunggal daun cengkeh dan daun pepaya serta ekstrak kombinasi daun cengkeh dan daun pepaya, diambil dari masing-masing larutan induk sebanyak 1,25 ml, kemudian diencerkan dengan aquadest steril 5ml.

f. Uji Kontrol Positif Dan Larutan Kontrol Negatif

Larutan yang digunakan sebagai kontrol positif yaitu disk doksisisiklin dan larutan yang digunakan sebagai kontrol negatif yaitu aquadest steril (Harharah *et al.*, 2021).

g. Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri tunggal dan kombinasi ekstrak daun cengkeh dan daun pepaya menggunakan metode difusi cakram. Tahap pertama mempersiapkan alat dan bahan. Suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* diambil menggunakan mikropipet kemudian masukkan ke dalam cawan petri, kemudian dituangkan media NA (Natrium agar) kedalam cawan petri menggunakan metode *pour plate* (metode tuang) lalu diratakan dengan memutar media searah angka delapan supaya homogen (Santoso *et al.* 2018), setiap cawan petri dibagi menjadi 5 bagian. Dilakukan pelabelan pada setiap bagian. Tahap selanjutnya merendam paper disk pada masing – masing konsentrasi perbandingan ekstrak daun cengkeh dan daun pepaya untuk kontrol positif menggunakan paper disk doksisisiklin sedangkan untuk kontrol negatif dicelupkan pada aquades steril selama 15 menit (Wijayanti & Safitri, 2018).

Masing-masing konsentrasi ekstrak diencerkan menggunakan aquadest steril. Selanjutnya paper disk diletakkan di atas media agar yang telah dituangkan suspensi *Staphylococcus epidermidis* dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Setelah nya cawan petri ditutup,

kemudian panaskan hanya sisi dari cawan diatas api bunsen dengan memutar-mutar agar cawan petri lebih steril. Kemudian tutup bagian tepi cawan petri menggunakan plastik wrap dan dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 1x24 jam (Ugha *et al.*, 2019) dengan posisi cawan petri terbalik dengan tujuan uap air yang terbentuk selama inkubasi tidak jatuh pada permukaan media sehingga tidak mempengaruhi hasil pengamatan (Tandah, 2016).

#### h. Pengamatan Hasil Aktivitas Antibakteri

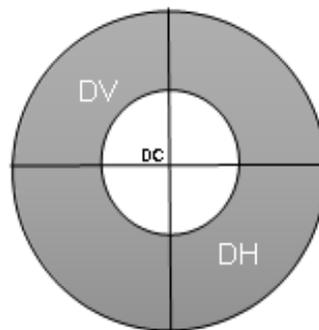
Setelah dilakukan inkubasi 24 jam, zona bening sekitar cakram merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji dan dinyatakan dengan luas zona hambat (Toy *et al.*,2015).

Langkah pengamatan antibakteri adalah sebagai berikut :

- 1) Tahap pertama dilakukan dengan meletakkan cawan petri secara berurutan di atas meja sesuai dengan perlakuannya
- 2) Untuk tahap kedua yaitu meletakkan cawan petri secara terbalik dan tutup cawan petri tidak terbuka.
- 3) Langkah yang ketiga dilakukan pengukuran diameter zona hambat yang muncul pada masing-masing perlakuan dengan menggunakan jangka sorong menggunakan satuan milimeter (Agustin *et al.*, 2019).

Diameter zona hambat diukur dengan rumus sebagai berikut :

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



**Gambar 3. 1 Pengukuran Diameter Zona Hambat Bakteri**

Keterangan:

DH (Diameter zonahambat horizontal)

DV (Diameter zonahambat vertikal)

DC (Diameter cakram)

 (Zona hambat) (Toy *et al.*, 2015).

## H. Analisis Data

Hasil data yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri ekstrak tunggal dan kombinasi daun cengkeh dan pepaya terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dianalisis menggunakan program SPSS 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 menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena data yang digunakan kurang dari 50 sampel yaitu 3 kali replikasi (Sabilillah *et al.*, 2016). Uji tahap selanjutnya dilakukan uji *Levene's test* yaitu untuk mengetahui homogenitas data. Data

dikatakan homogen (Rosidah *et al.*, 2014). Dianalisa menggunakan uji statistik *One Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95%

Uji analisa dilanjutkan dengan *Post hoc test* (LSD). Uji ini merupakan uji yang dilakukan karena zona hambat terdapat perbedaan, fungsinya untuk mengetahui hasil data yang berbeda terdapat pada perbandingan dan konsentrasi mana saja (Noviyanto, *et al.*, 2020).