

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental murni yaitu daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) diekstraksi dengan metode maserasi yang menggunakan pelarut etanol 96%. Kemudian hasil dari ekstrak akan diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *propionibacterium acnes* menggunakan kombinasi ekstrak. Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi cakram, dimana dalam teknik ini kertas cakram sebagai media untuk menyerap bahan antibakteri direndam hingga jenuh dalam senyawa yang diisi dengan senyawa uji kemudian kertas cakram diletakkan pada media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri.

B. Waktu Dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni – Agustus 2024

2. Tempat Penelitian

- a. Determinasi tanaman dapat dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro (UNDIP).
- b. Ekstraksi daun nangka dan daun sirsak dan skrining metabolit sekunder dapat dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi S1 Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

- c. Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi S1 Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang berasal dari Daerah Gunung Pati Semarang Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang mudah masih segar dan berwarna hijau. Masing-masing sebanyak 3 kg yang berasal dari Daerah Gunung Pati Semarang Jawa Tengah.

D. Defenisi 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 dapat terhindar dari sinar matahari langsung.

2. Ekstrak Daun Nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.)

Ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) adalah ekstrak yang didapatkan dari tanaman menggunakan metode maserasi selama 3 hari menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dilanjutkan pada proses rotary evaporator menggunakan suhu 40°C.

3. Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) adalah ekstrak yang didapatkan dari tanaman menggunakan metode maserasi selama 3 hari menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dilanjutkan pada proses rotary evaporator menggunakan suhu 40°C.

4. Kombinasi Ekstrak Daun Nangka dan Ekstrak Daun Sirsak

Pada penelitian ini kombinasi yang digunakan adalah kombinasi ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang menggunakan perbandingan 1:1 (ekstrak daun nangka : daun sirsak), 1:2 (ekstrak daun nangka : daun sirsak), dan 2:1 (ekstrak daun nangka : daun sirsak).

5. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri adalah uji yang dilakukan dengan sampel kombinasi ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* menggunakan metode difusi cakram dan hasilnya terbentuk zona hambat.

6. Zona Hambat

Zona hambat adalah daerah jernih di sekeliling cakram dari media pertumbuhan bakteri uji yang tidak ditumbuhi bakteri (Putri *et al.*, 2016).

E. Variabel Penelitian

Variabel yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu :

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang akan digunakan pada penelitian ini adalah hasil kombinasi ekstraksi simplisia daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan ekstraksi simplisia daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan konsentrasi 5%, 10:%, 15%, 20%, dan 25% dan menggunakan pelarut etanol 96%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah uji diameter zona hambat ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

3. Variabel Terkendali

Variabel yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.), pembuatan ekstrak, pelarut yang digunakan, media pertumbuhan, lama inkubasi, pengujian antibakteri.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu kamera, maserasi (toples kaca), kertas saring, gelas ukur, autoklaf (Hiramaya),

oven (Memmert UN-30), inkubator (Memmert), *laminar air flow* (Airtech), timbangan analitik (Ohaus), gunting, batang pengaduk kaca, kertas aluminium foil, cawan petri, erlemeyer 250 ml (Iwaki), *beaker glass* (Pyrex/Iwaki), pinset, mikro pipet, tabung reaksi (Pyrex/Iwaki), jangka sorong, kertas label, pulpen, cawan porselin, bunsen, kompor, jarum ose, kertas cakram steril, lemari pendingin, kasa steril, *colony counter*, tisu, kapas, benang, blender (Philips), *moisture analyzer*, *rotary evaporator*, water bath (Anametri DHH-8), pipet, sendok tanduk, masker, handscoon.

b. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.), daun sirsak (*Annona muricata* L.), aquades, aquades steril, medium nutrient agar (NA), serbuk Mg (magnesium), Reagen FeCl₃ (besi klorida), etanol 96%, alkohol 70%, NaCl 0,9%, dimetil sulfoksida (DMSO), bakteri *Propionibacterium acnes*, disk doksisisiklin, HCl pekat (asam klorida), cat gram A (Kristal violet), cat gram B (larutan lugol), cat gram C (alkohol aseton), cat gram D (larutan safranin), Mc.farland standar 0,5 (perkiraan bakteri suspensi/ml $1,5 \times 10^8$).

G. Prosedur Kerja

1. Determinasi Tanaman

Sampel uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.).

Sebelum dilakukan ekstraksi, tumbuhan terlebih dahulu di determinasi untuk mengidentifikasi ketepatan spesies. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro (UNDIP).

2. Pemanenan Daun Nangka dan Daun Sirsak

Pemanenan daun nangka dan daun sirsak dapat dipanen di Daerah Gunung Pati Semarang Jawa Tengah, daun nangka dan daun sirsak yang digunakan adalah daun yang mudah masih segar dan berwarna hijau.

3. Pembuatan Simplisia Daun Nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) Dan Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

Langkah pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah tahap pemanenan daun nangka dan daun sirsak yang dilakukan di Daerah Gunung Pati Semarang Jawa Tengah. Setelah itu pembuatan serbuk simplisia daun nangka dan daun sirsak yang sudah diperoleh masing-masing 3 kg. Selanjutnya dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran atau benda asing seperti debu. Lalu dicuci dengan air bersih yang mengalir. Selanjutnya proses perajangan simplisia daun nangka dan daun sirsak. Setelah itu proses pengeringan simplisia daun nangka dan sirsak, yang dikeringkan dengan cara menggunakan sinar matahari tidak langsung dan disebar diatas nampan yang ditutupi dengan kain hitam. Kemudian langkah selanjutnya adalah sortasi kering yang bertujuan untuk memisahkan benda asing seperti tanaman yang tidak diperlukan yang tertinggal dan menempel pada simpliasi yang masih kering, proses ini

dapat digunakan dengan cara manual. Setelah itu pembuatan serbuk simplisia menggunakan blender. Langkah selanjutnya yaitu proses pengayakan simplisia dengan pengayakan 40 mesh yang sudah dihaluskan menggunakan blender. Kemudian simplisia daun nangka dan daun sirsak yang sudah jadi serbuk halus ditimbang lalu disimpan pada tempat toples kaca untuk dijadikan ekstraksi (Zai *et al.*, 2019).

4. Standarisasi Simplisia Parameter Non Spesifik

a. Uji Kadar Air Simplisia

Uji kadar air pada simplisia yaitu dilakukan pada simplisia yang sudah kering dengan menggunakan cara penimbangan menggunakan cawan porselin ditara selanjutnya ditimbang simplisia menggunakan neraca analitik sebanyak 2 gram, kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Selanjutnya di dinginkan dalam desikator selama 20 menit dan timbang bobotnya kembali (Syafriada *et al.*, 2018).

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

Keterangan :

a = Berat sampel sebelum pemanasan (gram)

b = Berat sampel setelah pemanasan (gram)

b. Uji Kadar Abu Simplisia

Uji kadar abu simplisia pada daun nangka dan daun sirsak masing-masing dilakukan dengan cara dimasukkan 2 Gram serbuk simplisia daun nangka dan daun sirsak ke dalam kurs porselin kemudian ditimbang dan ratakan serbuk simplisia yang ada di dalam kurs porselin. Kemudian perlahan-lahan dipanaskan dengan suhu 600°C selama 3 jam. Lalu kadar abu simplisia didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot yang konstan (Anggraeni, 2020b).

Sehingga kadar abu total simplisia dihitung dengan rumus :

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

5. Pembuatan ekstrak daun nangka dan daun sirsak

a. Ekstraksi menggunakan metode maserasi

Pembuatan ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) masing-masing dibuat sebanyak 300 Gram dimasukkan ke dalam wadah maserasi, direndam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1.500 ml dengan perbandingan (1:5) lalu ditutup dengan aluminium foil, dimana proses maserasi dilakukan pada ruangan yang terlindung dari sinar matahari selama 3x24 jam sambil sekali-kali diaduk. Kemudian ekstrak yang diperoleh selama 3 hari dari maserasi disaring menggunakan kain flannel. Selanjutnya dilakukan proses remaserasi selama 2 hari dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 900 ml dengan perbandingan (1:3) kemudian filtrat

yang diperoleh dari daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) diuapkan dengan rotary evaporator dengan suhu 50°C dan dilanjutkan diatas waterbath dengan suhu yang sama sehingga dapat diperoleh ekstrak kental etanol daun nangka dan daun sirsak (Ramadhani & Novema, 2022).

6. Perhitungan Nilai Rendemen Ekstrak

Perhitungan nilai rendemen ekstrak pada masing-masing ekstrak daun nangka dan daun sirsak yaitu hasil dari berat ekstrak yang diperoleh dibagi dengan berat bahan baku awal dikali 100% (Syamsul *et al.*, 2020).

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

7. Uji Kadar Air Pada Ekstrak

Penetapan kadar air menggunakan alat *moisture balance* dengan cara menimbang 2 Gram ekstrak daun nangka dan daun sirsak kemudian dimasukkan kedalam lempeng logam, diratakan. Tunggu sampai alat berbunyi yang menandakan analisis sudah selesai. Kadar air pada ekstrak yang baik adalah <10% (Aini *et al.*, 2023).

8. Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dapat dilakukan dengan memasukkan masing-masing ekstrak kental daun nangka dan daun sirsak ke dalam tabung reaksi yang berbeda lalu ditambahkan dengan 5 tetes prekasi asam sulfat (H₂SO₄) pekat dan 2 ml larutan kalium dikromat lalu gojog dan amati pada perubahan warna ekstrak. Adanya etanol pada ekstrak ditunjukkan adanya perubahan warna jingga menjadi hijau kebiruan (Klau *et al.*, 2021).

9. Standarisasi Ekstrak Parameter Spesifik

a. Pengamatan Organoleptik

Pengamatan organoleptik adalah dapat dilakukan dengan pengenalan secara fisik menggunakan panca indra untuk menggambarkan bentuk, bau, warna, dari ekstrak daun nangka dan daun sirsak (Utami, 2020).

b. Skrining Fitokimia

Uji fitokimia pada ekstrak daun nangka dan daun sirsak adalah sebagai berikut :

1) Uji Flavonoid

Ekstrak daun nangka dan daun sirsak masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg lalu masing-masing ekstrak ditambahkan serbuk magnesium (Mg) sebanyak 2 mg dan beri 3 tetes HCl pekat. Kemudian akan terbentuknya perubahan warna merah, kuning atau jingga maka menandakan reaksi positif adanya kandungan flavonoid (Nuralifah *et al.*, 2019).

2) Uji Saponin

Ekstrak daun nangka dan daun sirsak masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian ditambahkan 20 ml air panas. Selanjutnya di kocok kuat selama 10 detik, maka akan terbentuk buih yang stabil, dan tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan positif mengandung saponin (Fadhila & Etika, 2023).

3) Uji Tanin

Ekstrak daun nangka dan daun sirsak masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg kemudian ditambahkan beberapa tetes preaksi FeCl_3 1% menunjukkan perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru kehitaman maka positif mengandung tanin (Reiza *et al.*, 2019).

4) Uji Alkaloid

Siapkan enam tabung reaksi, lalu masukkan 10 mg ekstrak daun nangka dan daun sirsak dalam masing-masing tabung. Kemudian tambahkan 10 ml kloroform diaduk rata. Lalu 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 tambah 3 tetes pereaksi dragendrof jika terdapat endapan jingga atau merah coklat, maka menunjukkan adanya kandungan alkaloid (Syamsul *et al.*, 2016).

5) Uji Fenolik

Timbang 10 mg ekstrak daun nangka dan daun sirsak, kemudian tambahkan 20 ml air panas dan tambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1%. Jika hasil terbentuk warna biru kehitaman atau

hijau maka menunjukkan adanya kandungan fenolik (Karim, 2017).

10. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dapat dilakukan pewarnaan gram pada bakteri untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah bakteri *Propionibacterium acnes*. Langkah pertama yang dilakukan adalah membersihkan object glass menggunakan alkohol 70% kemudian dikeringkan, biakkan bakteri *Propionibacterium acnes* pada agar miring menggunakan jarum ose steril dan oleskan secara merata diatas kaca object. Kemudian difiksasi diatas bunsen hingga kering dengan cara melewati object glass. Pada object glass yang sudah kering kemudian ditetaskan larutan kristal violet yang dibiarkan selama 1 menit, setelah itu bilas menggunakan aquadest dan keringkan dengan tisu. Langkah kedua yaitu beri 1-2 tetes larutan lugol dan didiamkan selama 1 menit setelah itu bilas dengan aquadest dan keringkan dengan tisu. Langkah ketiga yaitu kaca object ditetaskan larutan pemucat warna yaitu alkohol 70% dan diamkan selama 15 detik setelah itu bilas menggunakan aquadest dan keringkan dengan tisu. Kemudian amati bentuk hasil pewarnaan Gram pada bakteri menggunakan mikroskop dengan pemebesaran 40 x, sehingga bakteri dinyatakan bersifat gram positif berdampak berwarna ungu dan bakteri yang bersifat gram negatif berwarna merah (Wahdaningsih *et al.*, 2014).

11. Sterilisasi alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu. Langkah pertama dilakukan pencucian alat yang akan digunakan terlebih dahulu hingga bersih. Alat-alat non gelas dapat disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Sedangkan alat-alat gelas dibungkus terlebih dahulu sebelum disterilkan menggunakan oven selama 1 jam dengan menggunakan suhu 180°C (Gunarti *et al.*, 2021).

12. Pembuatan Media

a. Pembuatan Media NA

Timbang media Nutrien Agar (NA) sebanyak 5 Gram lalu larutkan dengan 250 ml aquadest menggunakan Erlenmeyer, kemudian panaskan dengan penangas air mendidih atau dalam aliran uap. Selanjutnya media disterilkan dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian biarkan pada suhu ruang hingga media memadat (Juariah & Sari, 2018).

b. Inokulasi Bakteri

Inokulasi bakteri merupakan penumbuhan bakteri dalam cawan petri pada media agar yang sudah dibuat. Langkah pertama dalam inokulasi bakteri yaitu pengambilan 1 ose bakteri *Propionibacterium acnes* lalu digoreskan Nutrien Agar (NA) miring secara zig-zag dari bawah hingga keatas, lalu diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam (Amanda *et al.*, 2021).

c. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dapat dilakukan dengan cara ambil masing-masing bakteri *Propionibacterium acnes* sebanyak 3 ose lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologi 0,9% kemudian tabung reaksi dikocok hingga homogen. Lalu disamakan dengan larutan standar Mc Farland yang telah dibuat. Sehingga jika kekeruhan suspensi bakteri belum sama dengan larutan pembanding, maka dapat diambil kembali bakteri *Propionibacterium acnes* dengan menggunakan kawat ose hingga mencapai kekeruhan yang sama (Sakramentia *et al.*,2019).

d. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Ekstrak Daun Nangka Dan Daun Sirsak

Konsentrasi ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) ditentukan menggunakan 5 variasi konsentrasi larutan uji yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% dari larutan induk 100%, kemudian dibuat perbandingan konsentrasi berdasarkan hasil uji.

Rumus Pengenceran :

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

Keterangan :

V1 = Konsentrasi awal

C1 = Volume yang diperlukan

V2 = Konsentrasi yang akan dibuat

C2 = Volume yang akan dibuat

Pada larutan induk dengan konsentrasi 100%, kemudian dibuat konsentrasi ekstrak kombinasi pada ekstrak daun nangka dan daun sirsak yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%. Pada konsentrasi 5% ekstrak daun nangka dan daun sirsak diambil larutan induk sebanyak 0,25 ml, diencerkan dengan DMSO 5 ml. Pada konsentrasi 10% ekstrak daun nangka dan daun sirsak diambil masing-masing larutan induk sebanyak 0,5 ml, diencerkan dengan DMSO 5 ml. Konsentrasi 15% ekstrak daun nangka dan daun sirsak dari masing-masing larutan induk diambil 0,75 ml, diencerkan dengan DMSO 5 ml. Pada Konsentrasi 20% ekstrak daun nangka dan daun sirsak diambil masing-masing larutan induk 1 ml, diencerkan dengan DMSO 5 ml. dan pada konsentrasi 25% ekstrak daun nangka dan daun sirsak diambil masing-masing larutan induk 1,25 ml, diencerkan dengan DMSO 5 ml.

e. Pembuatan Uji Kontrol positif dan Kontrol Negatif

Larutan uji kontrol positif yang digunakan adalah disk doksisisiklin dan larutan uji kontrol negatif adalah dimetil sulfoksida (DMSO) (Chandra *et al.*, 2023).

f. Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak daun nangka dan daun sirsak dengan menggunakan metode difusi cakram. Tahap pertama yaitu mempersiapkan alat dan bahan. Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* diambil menggunakan mikropipet lalu dimasukkan kedalam cawan petri, kemudian dituangkan media NA (Natrium Agar) ke dalam cawan petri menggunakan metode pour plate yaitu metode tuang lalu diratakan dengan memutar media mengikuti pola angka delapan supaya homogen. Lalu cawan petri dibagi menjadi 5 bagian kemudian dilakukan pelabelan pada setiap bagian. Selanjutnya rendam paper disk pada masing-masing konsentrasi perbandingan ekstrak daun nangka dan daun sirsak, untuk kontrol positif menggunakan paper disk doksisisiklin dan untuk kontrol negatif dicelupkan menggunakan dimetil sulfoksida (DMSO) selama 15 menit (Amanda *et al.*, 2021).

Masing-masing konsentrasi ekstrak diencerkan menggunakan dimetil sulfoksida (DMSO) kemudian paper disk diletakkan diatas media agar yang telah dituangkan suspensi *Propionibacterium acnes* dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Setelah itu cawan petri ditutup lalu panaskan sisi cawan petri diatas bunsen sambil memutar-mutar agar cawan petri lebih steril. Lalu tutup bagian tepi cawan petri menggunakan plastik wrap dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam (Ramadhani & Novema, 2022).

g. Pengamatan Hasil Aktivitas Antibakteri

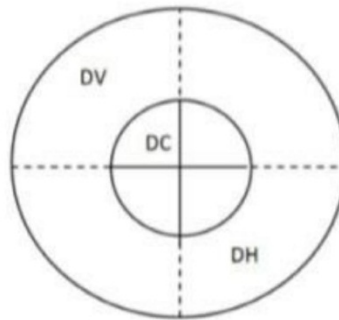
Pengamatan hasil aktivitas antibakteri dapat dilakukan inkubasi selama 24 jam, zona bening disekitar kertas cakram merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji dan dinyatakan dengan diameter zona hambat, sehingga zona hambat yang terbentuk disekitar cakram diukur dengan diameter vertikal dan horizontal dengan satuan millimeter (mm) menggunakan jangka sorong (Magvirah *et al.*, 2019).

Langkah-langkah dalam pengamatan antibakteri adalah :

- 1) Langkah pertama yaitu dilakukan dengan letakkan cawan petri secara berurutan sesuai dengan perlakuannya.
- 2) Langkah kedua yaitu letakkan cawan petri dengan cara terbalik dan tutup cawan petri tidak terbuka.
- 3) Langkah terakhir yaitu lakukan pengukuran diameter zona hambat yang muncul pada masing-masing perlakuan dengan menggunakan jangka sorong dan menggunakan satuan millimeter (mm) (Wally *et al.*, 2022).

Rumus diameter zona hambat diukur sebagai berikut yaitu :

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



Gambar 3. 1 Pengukuran Diameter Zona Hambat Bakteri
Sumber : (Sari & Sumadewi, 2019)

Keterangan:

- : zona hambat
 DV : diameter vertikal
 DC : diameter cakram
 DH : diameter horizontal

H. Analisis Data

Hasil analisis data yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* yaitu dianalisis menggunakan SPSS. Langkah pertama yang dilakukan yaitu melakukan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data yang dianalisis dapat berdistribusi normal atau tidak (Pratama & Permatasari, 2021). Sehingga uji normalitas pada penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-willk normality test* dikarenakan data kurang dari 50 sampel yaitu 3 kali replikasi dengan taraf uji signifikan 0,05 atau 5%, sehingga data yang baik yaitu data yang terdistribusi normal dan homogen jika $p\text{-value} > 0,005$ (Amanda Rizki *et al.*, 2021). Uji tahap selanjutnya yaitu dilakukan uji *Levene's test* yaitu untuk mengetahui homogenitas data, data dikatakan homogen dianalisis menggunakan uji statistik *One Way Anova* (Suryani *et al.*, 2019). Jika nilai $p\text{-value} < 0,05$ yaitu berarti data tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji non parametrik (Agustin & Permatasari, 2020).