

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Rancangan penelitian ini yaitu menggunakan jenis penelitian eksperimental yang terdiri dari beberapa tahapan meliputi pengumpulan bahan, determinasi tanaman, pembuatan simplisia, pembuatan ekstrak, pemeriksaan skrining fitokimia simplisia kering dan ekstrak, dilakukan uji aktifitas antibakteri ekstrak bunga (*Ipomoea carnea* Jacq) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode difusi cakram dengan 3 kali pengulangan, uji kromatografi lapis tipis, fraksinasi kolom ekstrak etanol bunga *I. carnea*, kemudian melakukan uji pemurnian yang akan dikarakterisasi dengan kromatografi lapis tipis (untuk mendapatkan 1 spot noda sebagai tandanya senyawa tersebut murni), setelah itu dilakukan uji titik leleh menggunakan *melting point*, kemudian dilakukan analisa menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis dan IR, lalu terakhir dianalisa statistik pada aktivitas bakteri dengan aplikasi SPSS Versi 26.

#### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Labotatorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Oktober 2021 sampai dengan Mei 2022.

#### 3.3 Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.3.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah corong (PYREX), erlenmeyer (IWAKI), *beaker glass* (IWAKI), gelas ukur (PYREX), tabung reaksi, labu ukur (HERMA), jarum ose, cawan petri, kertas *disk*, batang pengaduk, *Hot plate* (MASPION), pipet volume (HERMA), Bola hisap, *yellow tip* dan *blue tip*, *laminar air flow* (LAF AV-100), *autoclave*, *vaccum rotary evaporator* (EYELA OSB-2100), *waterbath*, pipet tetes, plat tetes, botol coklat, spatula, pinset, *incubator* (GEMMYCO DIGITAL # IN-601), timbangan bahan, neraca analitik (ADAM SCIENTIFIC), lampu bunsen, vial,

rak tabung reaksi, kapas lidi steril, alat maserator, *mikropipet*, rangkaian alat kolom kromatografi, *chamber*, Standar Mc. Farland No. 0.5, aluminium foil, *tissue*, *Oven* (GEMMYCO YCO-NO. 1), *Silica gel* (TLC 60 F<sub>254</sub> MERCK 1.05554.0001), pipa kapiler, lampu UV ( $\lambda$  254 dan 366 nm) sebagai penampak noda, Spektrofotometer UV-VIS (*Thermo Scientific* 33-PPPTS 2017-L205-0006), Spektrofotometer IR, alat titik leleh (*MELTING POINT*)

### 3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu, bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq*) (1kg), Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), etil asetat (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>), n-heksana (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), *Pseudomonas aeruginosa*, media *Nutrient Agar* (NA), Aquades, NaCl 0,9 %, DMSO (Dimetil Sulfoksida), antibiotik ciprofloxacin 500 mg, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mater, besi (III) klorida (FeCl<sub>3</sub>) 1%, besi (III) klorida (FeCl<sub>3</sub>) 5% HCL 2 N, Natrium Hidroksida (NaOH) 10%, ammonia NH<sub>4</sub>, Magensium (Mg).

## 3.4 Variabel Penelitian

### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu karakteristik metabolit sekunder ekstrak bunga kangkung pagar (*Ipomea carnea*) dengan variasi pelarut Polar (etanol), Semi Polar (Etil asetat), Non polar (n-heksan) yang diperoleh sampel untuk diambil aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah penapisan fitokimia, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, karakterisasi isolat kadar zat aktif ekstrak bunga kangkung pagar (*Ipomea carnea*) secara UV-VIS dan uji aktivitas antibakteri dengan difusi cakram.

### 3.4.3 Definisi Operasional Variabel

Berikut ini adalah tabel definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini, yaitu:

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

| No                      | Variabel                                                      | Definisi                                                                                                                                                                                                                                                              | Alat Ukur                                                                                                                                                      | Skala   | Hasil Ukur                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Variabel Bebas</b>   |                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                |         |                                                                                                                                                                                               |
| 1                       | Karakteristik metabolit sekunder ekstrak bunga kangkung pagar | Karakteristik metabolit sekunder ekstrak bunga kangkung pagar ( <i>Ipomea carnea</i> ) dengan variasi pelarut Non polar (n-heksan), Semi Polar (Etil asetat), Polar (ethanol) yang diperoleh sampel untuk diambil aktivitas antibakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Pengujian kimia - fisika meliputi organoleptik (warna, bau, dan bentuk), penapisan fitokimia, uji pola kromatogram, kadar zat aktif, uji aktivitas antibakteri | -       | -                                                                                                                                                                                             |
| <b>Variabel Terikat</b> |                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                |         |                                                                                                                                                                                               |
| 2                       | Warna                                                         | Parameter secara visual menggunakan indera penglihatan (mata) untuk mengetahui warna ekstrak bunga kangkung pagar ( <i>Ipomoea carnea Jacq</i> )                                                                                                                      | Uji organoleptik                                                                                                                                               | Nominal | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bening</li> <li>2. Agak bening</li> <li>3. Agak kecoklatam</li> <li>4. Coklat</li> <li>5. Agak hijau</li> <li>6. Hijau</li> <li>7. Gelap</li> </ol> |
| 3                       | Aroma                                                         | Parameter fisik menggunakan indera penciuman (hidung) dalam pengujian sampel ekstrak bunga kangkung                                                                                                                                                                   | Uji Organoleptik                                                                                                                                               | Nominal | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bau lemah</li> <li>2. Bau tengik</li> <li>3. Bau khas</li> </ol>                                                                                    |

| No | Variabel                                                       | Definisi                                                                                                                                                                             | Alat Ukur                    | Skala   | Hasil Ukur                                                                   |
|----|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------|
| 4  | Bentuk                                                         | pagar ( <i>Ipomoea carnea Jacq</i> )<br>Parameter fisik menggunakan indera peraba dan penglihatan dalam pengujian sampel ekstrak bunga kangkung pagar ( <i>Ipomoea carnea Jacq</i> ) | Uji Organoleptik             | Nominal | 1. Sangat kental<br>2. Kental<br>3. Agak kental<br>4. Cair<br>5. Sangat cair |
| 5  | Penapisan Fitokimia                                            | Parameter uji dengan melihat perubahan warna atau endapan                                                                                                                            | Uji organoleptik             | Nominal | 1. Tidak berwarna<br>2. Tidak ada endapan<br>3. Berwarna, ada endapan        |
| 6  | Rf                                                             | Pengujian mengetahui jarak yang ditempuh ekstrak yang dihasilkan dengan simplisia awal                                                                                               | Uji kromatografi lapis tipis | Rasio   | Persen (%)                                                                   |
| 7  | Kadar aktif zat                                                | Kadar ekstrak bunga kangkung pagar yang diuji menggunakan spektrofotometer UV-VIS sebagai bagian dari karakteristik metabolit sekunder                                               | Spektrofotometer UV-VIS      | Rasio   | Persen (%)                                                                   |
| 8  | Daya hambat antibakteri terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Pengujian untuk mengukur zona hambat diseluruh kertas cakram                                                                                                                         | Jangka sorong digital        | Rasio   | Diameter zona hambat (milimeter)                                             |

### 3.5 Preparasi Sampel

#### 3.5.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan dalam penelitian. Pemeriksaan atau determinasi dilakukan di daerah BALITRO (Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat). Determinasi dilakukan dengan mencocokkan tanaman dengan ciri-ciri morfologi tumbuhan bunga kangkung pagar yang digunakan penelitian sesuai acuan pustaka.

#### 3.5.2 Preparasi Sampel

Setelah melakukan determinasi tanaman, sampel yang telah dikumpulkan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, lalu keringanginkan lalu dilakukan perajangan dan pengeringan dalam temperatur ruangan pada suhu 20°C – 25 °C agar kadar air yang terdapat pada sampel berkurang. Sampel yang telah dikeringkan dihaluskan menggunakan blender atau dipotong kecil-kecil agar memperluas permukaan hingga mempercepat laju proses pelarutan senyawa.

Setelah dihaluskan sampel di simpan pada wadah tertutup baik dan melakukan pengujian studi lebih lanjut.

### 3.6. Skrining Fitokimia Bunga Kangkung Pagar (*Ipomoea carnea Jacq*)

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidenifikasi kandungan senyawa kimia yang terdapat pada simplisia ataupun ekstrak bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq*). Adapaun skrining fitokimia yang harus dilakukan antara lain uji kandungan alkaloid, uji kandungan saponin, uji kandungan flavonoid, uji kandungan tanin, uji kandungan steroid dan terpenoid, dan uji kandungan polifenol.

#### 1. Uji Kandungan Alkaloid

2 – 4 gram bunga kangkung pagar dihaluskan dengan mortir dan stamper. Tambahkan 10 mL kloroform (CHCl<sub>3</sub>) dan ammonia (NH<sub>3</sub>) sambil terus digerus. Kemudian filtrat disaring dengan kapas dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, filtrat dikocok perlahan dengan

ditambahkan 10 tetes asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 2N. Campuran dibiarkan sampai terbentuk 2 lapisan yang terdiri dari lapisan asam dan lapisan kloroform. Lapisan asam diambil dengan pipet kaca tetes dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Lapisan asam ditambahkan pereaksi Mayer, jika terbentuk endapan putih maka positif Alkaloid (Abriyani & Fikayuniar, 2020). Kemudian untuk mengkonfirmasi adanya gugus alkaloid bisa juga pada tabung reaksi lainnya sebagian lapisan asam yang belum ditetesi pereaksi mayer tersebut ditambahkan beberapa tetes pereaksi Dragendorff, jika ada endapan jingga maka positif Alkaloid (Harborne, 1987; Abriyani *et al.*, 2021).

**2. Uji Kandungan Saponin**

Filtrat hasil pemanasan dengan aquades dimasukan kedalam tabung reaksi dikocok kuat dalam tabung reaksi selama 30 detik, terus menerus berbuih yang menunjukkan adanya saponin (Abriyani & Fikayuniar, 2020).

**3. Uji Kandungan Flavonoid**

Sebagian lapisan air dari hasil ekstrak diambil dan dipindahkan menggunakan pipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam klorida pekat ( $\text{HCl}$ ) dan ditambahkan beberapa serbuk magnesium, kemudian adanya warna jingga, merah muda hingga merah maka menunjukkan positif (+) flavonoid (Abriyani & Fikayuniar, 2020).

**4. Uji Kandungan Fenol dan Tanin**

Lapisan air dari ekstrak diambil dan dipindahkan menggunakan pipet kaca tetes kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan pereaksi besi klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) beberapa tetes hingga berwarna biru tua, hijau, hitam yang menunjukkan adanya fenol atau tanin (Abriyani & Fikayuniar, 2020).

**5. Uji Kandungan Steroid dan Triterpenoid**

Lapisan klorofom ditetaskan beberapa tetes ke tiga lubang plat tetes (*drop plate*), biarkan kering. Kemudian tambahkan beberapa tetes

pereaksi Liberman Buchard sehingga terbentuk warna hijau atau hijau kebiruan yang menunjukkan adanya steroid dan merah atau magenta menunjukkan adanya triterpenoid (Abriyani & Fikayuniar, 2020).

### 3.7. Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder

Pembuatan ekstrak bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi, yaitu sampel dirajang, ditimbang, kemudian di ekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol dengan cara maserasi secara berturut-turut. Masukkan sampel bunga kangkung pagar ke dalam maserator. Berikut ini prosedur dari setiap pelarut, adalah sebagai berikut :

- A. Pelarut non polar (n-heksana) dituang secara perlahan kedalam maserator. Kemudian, dibiarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia dilakukan pengadukan sesekali, lalu dilakukan selama empat hari hingga bening. Selanjutnya, disari ke dalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari tiap pelarut ekstrak diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 40-50°C sampai diperoleh ekstrak kental.
- B. Pelarut semi polar (etil asetat) dituang secara perlahan kedalam maserator. kemudian, dibiarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia dilakukan pengadukan sesekali, lalu dilakukan selama empat hari hingga bening. Selanjutnya, disari ke dalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari tiap pelarut ekstrak diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 40-50°C sampai diperoleh ekstrak kental.
- C. Pelarut polar (etanol) melakukan pengujian dengan cara dituang ke dalam maserator secara perlahan, kemudian dibiarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia dilakukan pengadukan sesekali, lalu dilakukan selama empat hari hingga bening. Selanjutnya, disari ke dalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari tiap pelarut ekstrak diuapkan menggunakan rotary dengan suhu 40-50°C sampai diperoleh ekstrak kental.

$$\% \text{ rendeman ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak yang di dapat (g)}}{\text{Berat simplisia yang di ekstrak (g)}} \times 100\%$$

### 3.8. Pengujian KLT dan Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom

Pengujian KLT pada simplisia kering dan masing-masing ekstrak selanjutnya dilakukan identifikasi eluen dengan masing-masing golongan metabolit sekunder. Identifikasi ini dilakukan dengan menggunakan plat KLT silika gel GF<sub>254</sub> yang mampu berfluoresensi di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dan dari pereagen penampak noda untuk melihat hasil spot noda pada plat KLT. Uji KLT terhadap ekstrak pekat menggunakan eluen yang kemudian akan ditotolkan pada plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler, biarkan hingga kering. Setelah kering dimasukkan kedalam bejana (*chamber*), bila fase gerak telah mencapai batas, lalu plat diangkat. Kemudian, noda yang terbentuk diamati dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm dan hitung nilai RF. Kemudian melakukan uji kromatografi kolom dengan menggunakan teknik SGP (*System Gradien Polarity*) dengan cara dimulai dari 100% ekstrak dengan perbandingan dan dengan volume tertentu. Setelah itu dilakukan

Fraksinasi merupakan metode penarikan senyawa pada ekstrak dengan dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Prinsip daripada kromatografi kolom ini yaitu teknik pemisahan yang didasari pada peristiwa adsorpsi. Sampelnya berupa larutan pekat yang disimpan di ujung atas kolom. Eluen mengalir secara terus-menerus ke dalam kolom. Adanya bantuan tekanan membuat eluen terus melewati kolom dan terjadinya proses pemisahan. Eluen yang pada umumnya digunakan untuk fraksinasi adalah n-heksana (non polar), etil asetat (semi polar), metanol (polar). Eluen yang pertama digunakan adalah dari yang non polar terlebih dahulu kemudian dinaikkan kepolarannya sampai terjadi pemisahan. Senyawa non polar akan larut pada pelarut non polar, dan sebaliknya (Lully H.E, 2016).

Pada kromatografi kolom digunakan fase diam silika gel, sedangkan fase gerak digunakan fase gerak yang memberikan pemisahan terbaik pada kromatografi lapis tipis. Silika gel 60 diaktifkan di oven pada suhu 100°C terlebih dahulu. Kemudian tambahkan sedikit fase gerak sehingga menjadi bubuk. Pelarut/eluen (fase gerak yang digunakan) dimasukkan ke dalam hingga hampir penuh dan

keadaan aliran kolom diatur dan bubuk dimasukkan menggunakan pipet secara perlahan-lahan ke dalam kolom. Setelah bubuk masuk, fase diam ini dielusai hingga homogen (Asih, 2009).

Sampel disiapkan dengan menambahkan silika gel kemudian digerus perlahan-lahan sehingga dapat terbentuk bubuk dan dimasukkan ke dalam kromatografi kolom dengan hati-hati melalui dinding kolom yang sudah disiapkan. Hasil kromatografi kolom ditampung dengan vial. Tiap fraksi di lihat secara mendetail kembali dengan uji KLT dan noda dilihat dengan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm dan 254 nm. Pola noda yang sama digabungkan dan dilihat nodanya dengan KLT. Selanjutnya dilakukan karakterisasi pada ekstrak (Asih, 2009).

### 3.9. Karakterisasi Metabolit Sekunder

Tahapan karakterisasi senyawa metabolit sekunder dilakukan uji KLT terlebih dahulu terhadap fraksi setelah kromatografi kolom untuk bertujuan mempertegas kandungan senyawa metabolit sekunder yang ada pada suatu fraksi senyawa murni. Uji klt ini dilihat 1 spot noda yang sudah di semprot dengan pereagen yang cocok pada suatu senyawa metabolit sekunder dan bercak noda dilihat dengan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm dan 254 nm. Setelah itu dilakukan pemeriksaan Uji *melting point* untuk melihat suatu senyawa yang sudah murni tanpa ada zat pengotor saat pengujian menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Senyawa dikatakan murni apabila selisih nilai titik lelehnya  $\leq 2^{\circ}\text{C}$ . Kemudian hasil fraksi murni dilakukan uji menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk mengetahui panjang gelombang hasil fraksi murni. Menurut penelitian Menezes Pemindaian dilakukan pada lateks antara panjang gelombang 200 – 400 nm dalam spektrofotometer UV-Vis, dengan kuvet kuarsa 1,0 cm untuk memverifikasi penyerapan ultraviolet di daerah (UVA, UVB dan UVC) pengujian dilakukan dalam rangkap tiga. Setelah itu, dilakukan pemeriksaan menggunakan spektrofotometri IR untuk menentukan gugus fungsi yang terkandung pada fraksi senyawa tersebut.

### 3.10. Pengujian Bioaktivitas Antibakteri

#### 3.10.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat yang terbuat dari kaca dilakukan menggunakan autoklaf dengan tekanan 2 atm pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Kemudian, alat yang terbuat dari plastik disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%.

#### 3.10.2 Pembuatan Media dan Suspensi Bakteri

*Nutrient Agar* ditimbang sebanyak 20 gram lalu dilarutkan dalam aquadest 1 liter, setelah itu dipanaskan di atas *hot plate* dan *magic stirrer* hingga larut. Kemudian dilakukan sterilisasi media menggunakan *autoclav* dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Setelah, dilakukan sterilisasi media dituang ke dalam cawan petri dan didiamkan di suhu kamar hingga mengeras (Rahmadani, 2015).

#### 3.10.3 Penanaman Bakteri

Penanaman bakteri diambil satu ose menggunakan ose steril selanjutnya digoreskan pada permukaan agar miring dengan cara silang (Zig-zag) dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  (Rahmadani, 2015).

#### 3.10.4 Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan Suspensi bakteri yang telah di tanam dan inkubasi selama 24 jam diambil 1-2 ose biakan bakteri disuspensikan dengan cara dimasukkan kedalam tabung berisi 0,5 mL NaCl fisiologis 0.9% lalu divortex sampai homogen dan dilihat kekeruhannya yang menandai bahwa ada pertumbuhan bakteri. Kekeruhan disetarakan dengan Mc. Farlan No.0,5 yaitu setara dengan  $10^8$  sel bakteri/mL. (Gayathiri *et al.*, 2018).

#### 3.10.5 Pembuatan larutan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Pembuatan kontrol positif dibuat dengan obat antibiotik ciprofloxacin 500 mg digerus, kemudian diambil sebanyak 25 mg lalu dilarutkan dalam aquadest steril sebanyak 25 ml. Larutan tersebut diambil 1 ml dan kemudian ditambahkan dengan aquadest steril hingga 10 ml, sehingga didapat konsentrasi larutan  $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Pembuatan kontrol negatif DMSO 10 % dibuat dengan cara ditimbang sebanyak 1 ml DMSO kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur, lalu ditambahkan aquadest hingga 10 ml.

### 3.10.6 Prosedur Uji Diameter Daerah Hambat (DDH) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Pengujian aktivitas antibakteri pada uji diameter daerah hambat (DDH) dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram (Kirby-Bauer) dan pengujian aktivitas antibakteri pada konsentrasi hambat minimum (KHM) dilakukan dengan menggunakan metode dilusi padat. Suspensi bakteri yang telah dibuat dan dibandingkan dengan MC Farland 0,5 (setara dengan  $10^8$  CFU/mL) diambil sebanyak 1 ml kemudian dipipet menggunakan mikropipet lalu dimasukkan ke dalam cawan petri berisi media *Nutrient Agar* yang sudah mengeras. Kemudian melakukan penambahan media NA sebanyak 10-15 mL dan dihomogenkan dengan cara diputar membentuk angka 8 sehingga tercampur merata. Setelah media memadat kemudian kertas cakram yang telah ditetesi larutan masing-masing ekstrak dengan konsentrasi yang sudah ditentukan sebanyak 20  $\mu$ l diletakkan di atas media agar. Penetasan larutan uji pada tiap cakram dilakukan pada cawan petri kosong.

Dalam penelitian ini dilakukan uji 3 ekstrak dengan beberapa perlakuan konsentrasi untuk melihat zona beningnya diantara lain : Ekstrak Etanol pembuatan larutan baku pada konsentrasi 5000 ppm lalu dibuat variasi konsentrasi 4500, ppm, 4000 ppm dan 3500 ppm, Ekstrak Etilasetat pembuatan larutan baku pada konsentrasi 5000 ppm lalu dibuat variasi konsentrasi 4500, ppm dan 4000 ppm, dan Ekstrak n-heksana pembuatan larutan baku pada konsentrasi 1000 ppm lalu dibuat variasi konsentrasi 900 ppm, 800 ppm, dan 700 ppm kemudian dengan ciprofloxacin 500 mg sebagai kontrol positif dan DMSO (Dimetil Sulfoksida) sebagai kontrol negatif. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37°C, adanya pertumbuhan bakteri uji dan terbentuknya zona bening di sekitar daerah cakram diamati, kemudian mengukur diameter zona bening menggunakan jangka sorong (Rachmatiah *et al.*, 2020).

Adanya daya hambat ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri yang ditandai zona bening di daerah sekeliling kertas cakram diukur diameternya sebagai diameter daerah hambat (DDH) dan kemudian menentukan

konsentrasi hambat minimum (KHM). Penentuan nilai KHM dilakukan dengan mengamati pada konsentrasi berapa mulai tidak terjadi pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan tidak terbentuknya kekeruhan pada media *Nutrient Agar* (NA) (Rachmatiah *et al.*, 2020).

Penentuan KHM dilakukan pengamatan adanya pertumbuhan bakteri uji pada konsentrasi ekstrak terendah yang menghasilkan diameter daerah habit. Setelah masa inkubasi berakhir, kekeruhan media yang menunjukkan kepadatan pertumbuhan bakteri uji diamati dan diberi tanda positif (+) untuk media yang tampak keruh dan diberi tanda negatif (-) jika media tersebut tidak terdapat kekeruhan (Rachmatiah *et al.*, 2020).

### 3.11 Analisis Data

Analisis data pada pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengukur zona bening dengan menggunakan kertas disk pada masing-masing konsentrasi. Setelah itu dilakukan analisis statistic dengan menggunakan cara *Analysis of Variance* (ANOVA) satu arah untuk membandingkan ketiga ekstrak dan Uji Normalitas (Kolmogorov-Smirnov Test) bila data terdistribusi normal dan homogen, lalu berlanjut dengan uji Kruskal Wallis sebagai pengganti ANOVA satu arah yang jika uji normalitas tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, setelah itu dilakukan uji lanjutan menggunakan uji compare means (*Independent sample-T Test*) untuk melihat perbedaan rata-rata dari dua atau lebih kelompok perlakuan.