

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian kualitatif *eksperimental* laboratorium dengan desain *Posttest-Only Control Group Design* yakni metode yang dilakukan pengamatan atau pengukuran pada kelompok eksperimen setelah perlakuan dan hasilnya dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran untuk mengetahui aktivitas antibakteri pada ekstrak kombinasi daun sirih (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) Walp) dan lidah buaya (*Aloe vera*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan April 2026 - Juli 2026.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Terpadu, Laboratorium Farmasetika dan Laboratorium Mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) Walp) dan lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm.f) yang diambil dari Desa Kalipare, Kecamatan Kalipare, Kabupaten Malang, Provinsi Jawa Timur. Populasi kultur murni bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) Walp) dan ekstrak lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm.f), dan kultur murni bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

3.4 Kriteria Sampel

a. Kriteria inklusi

- 1) Kriteria inklusi daun salam (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) Walp) yang diambil berwarna hijau segar, dipetik dari tangkai ketiga setelah pucuk sampai tangkai paling bawah, tidak berlubang, tidak terdapat bercak hitam atau hama.
- 2) Kriteria inklusi lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm.f) yang digunakan yakni daun yang hijau segar dan utuh, memiliki ukuran $\pm$ panjang 30 cm, lebar 5 cm, dan tebal 2 cm, tidak layu.
- 3) Kriteria inklusi *Staphylococcus epidermidis* yang digunakan yakni kultur murni dengan usia isolat 1x24 jam dan tidak terkontaminasi.

b. Kriteria eksklusi

- 1) Kriteria eksklusi daun salam (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) Walp) yang rusak, layu, kering, berlubang, berwarna kuning kecoklatan dan terserang hama.
- 2) Kriteria eksklusi lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm.f) yang ukurannya kurang dari panjang 30 cm, lebar 5 cm, dan tebal 2 cm, patah atau rusak, tidak hijau segar dan kering.
- 3) Kriteria eksklusi *Staphylococcus epidermidis* yang bukan koloni murni, tumbuh jamur, telah terkontaminasi dan usia isolat kurang 18 jam dan lebih dari 1x24 jam.

3.5 Determinasi Tanaman

Daun salam (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) Walp) dan lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm.f) dilakukan determinasi sebagai identifikasi awal untuk pengamatan secara fisiologis tumbuhan yang dilakukan di UPT Laboratorium Materia Medica Batu (MMB), Batu, Kabupaten Batu, Jawa Timur.

3.6 Identifikasi Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini berupa konsentrasi ekstrak 75% pada daun salam dan konsentrasi ekstrak 75% lidah buaya dengan perbedaan perbandingan

yaitu 1:1, 1:2, dan 2:1 sebagai sediaan gel yang kemudian diujikan pada bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

3.6.2 Variabel Terikat

a. Mutu fisik

Uji mutu fisik seperti uji organoleptis, uji daya sebar, uji pH, uji daya lekat, homogenitas dan viskositas dari formulasi sediaan gel ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) Walp) dan lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm.f).

b. Zona hambat

Zona hambat yang terbentuk karena adanya aktivitas antibakteri oleh bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan dinyatakan sebagai diameter zona bening (mm).

3.6.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini berupa pelarut etanol 70% yang digunakan dalam maserasi, suhu *rotary evaporator* menggunakan 60 °C, suhu dan waktu *autoclave* untuk sterilisasi adalah 121 °C selama 15 menit, media peremajaan bakteri menggunakan *Nutrient agar* (NA) dan media pertumbuhan dan uji aktivitas antibakteri yang digunakan *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan waktu inkubasi bakteri 1x24 jam dan suhu inkubasi pada inkubator 37 °C.

3.7 Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Parameter
Daun Salam	Daun Salam (<i>Syzygium polyanthum</i> (WIGHT) Walp) adalah bagian daun dari pohon salam, daunnya tunggal dan	Pengamatan visual	Ordinal	Daun yang diambil berwarna hijau segar, dipetik dari tangkai ketiga setelah pucuk sampai tangkai paling bawah, tidak berlubang, tidak

	berselang-seling, berbentuk elips hingga lanset, ujungnya meruncing, tepi daun halus tanpa bergerigi, berwarna hijau tua mengkilap di bagian atas dan muda di bagian bawah, daunnya memiliki aroma khas yang harum dan rasa yang sedikit pahit. Daun salam yang digunakan telah dilakukan determinasi.			terdapat bercak hitam atau hama.
Lidah buaya	Daun lidah buaya (<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f) adalah bagian daun dari tanaman lidah buaya, daunnya berbentuk memanjang seperti pedang dengan ujung yang meruncing, dan lidah buaya tebal dan berdaging. Tepi daun bergerigi halus dengan duri kecil	Pengamatan visual	Ordinal	Lidah buaya yang digunakan yaitu daun yang hijau segar dan utuh, memiliki ukuran $\pm$ panjang 30 cm, lebar 5 cm, dan tebal 2 cm, tidak layu.

	berwarna putih, warna daun lidah buaya hijau muda, dengan permukaan daun yang mengkilap dan memiliki bintik-bintik putih yang samar. Lidah buaya yang digunakan telah dilakukan determinasi.			
Maserasi	Maserasi adalah metode pemisahan senyawa metabolit sekunder dari bahan tumbuhan dengan cara merendam simplisia dalam pelarut organik etanol 70% pada suhu ruang dengan wadah yang tertutup selama 3 x 24 jam, yang kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan ekstrak cair dari ampas bahan tanaman.	<i>Stopwatch</i> , pengaduk, termometer	Interval	Waktu maserasi 3-5 hari, frekuensi pengadukan 1 kali dalam sehari, suhu maserasi 26°C atau suhu ruang.
Formulasi	Formulasi adalah proses pencampuran	Timbangan	Rasio	Bobot masing-masing bahan.

	bahan aktif ekstrak daun salam (<i>Syzygium polyanthum</i> (WIGHT) Walp) dan lidah buaya (<i>Aloe vera</i>) dengan bahan excipien yakni carbopol (g), TEA (g), propilen glikol (g), metil paraben (g), dan aqudest (mL) untuk menghasilkan sediaan akhir berupa gel topikal.			
Bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i> adalah golongan bakteri gram positif, berbentuk kokus (bulat) yang tumbuh berkelompok seperti anggur, didapatkan dari kultur murni dan diremajakan pada media <i>Nutrient agar</i> (NA), kemudian disuspensi	Tanda pengenal bakteri	Nominal	Nomor ATCC

	menggunakan larutan NaCl 0,9%.			
Zona hambat	Zona hambat adalah daerah bening atau jernih dan bebas dari pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i> yang terbentuk di sekitar lubang atau sumuran yang telah dimasukkan sediaan gel dengan kombinasi ekstrak daun salam (<i>Syzygium polyanthum</i> (WIGHT) Walp) dan ekstrak lidah buaya (<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f) untuk uji aktivitas antibakteri. Zona hambat diukur dengan diameter satuan milimeter (mm), dari wilayah jernih yang terbentuk di area lubang atau sumuran pada media agar.	Jangka sorong	Interval	Diameter zona hambat.

3.8 Alat dan Bahan

a. Alat

- | | |
|--------------------------|----------------------------------|
| 1. Cawan petri | 19. Plastik <i>wrap</i> |
| 2. Ose | 20. Kasa steril |
| 3. Bunsen dan korek | 21. Vial |
| 4. Autoklaf | 22. Spuil 1 mL |
| 5. Tabung reaksi dan rak | 23. Gelas ukur |
| 6. Inkubator | 24. <i>Beaker glass</i> |
| 7. Pinset | 25. Oven |
| 8. <i>Cork borrrer</i> | 26. Toples |
| 9. Blender | 27. Cawan porselen |
| 10. Timbangan | 28. <i>Evaporator</i> |
| 11. Corong kaca | 29. <i>Waterbath</i> |
| 12. Erlenmeyer | 30. Batang pengaduk |
| 13. Pipet tetes | 31. Kain lab |
| 14. Mikropipet | 32. Mortir dan stemper |
| 15. Jangka sorong | 33. <i>Lamina Air Flow</i> (LAF) |
| 16. Vortex | 34. Tisu |
| 17. Timbangan analitik | 35. kapas |
| 18. Spidol | |

b. Bahan

- | | |
|--|--------------------------|
| 1. Daun salam (<i>Syzygium polyanthum</i> (WIGHT) Walp) | 7. Etanol 70% |
| 2. Lidah buaya (<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f) | 8. Carbopol 940 |
| 3. Bakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 9. TEA |
| 4. <i>Nutrient agar</i> (NA) | 10. Propopilen Glikol |
| 5. <i>Mueller-Hinton Agar</i> (MHA) | 11. Metil Paraben |
| 6. Klindamisin | 12. Natrium Metabisulfat |
| | 13. Aqudest |

3.9 Formulasi Sediaan Gel

3.9.1 Formulasi yang digunakan

Tabel 3. 2 Formulasi sediaan gel kombinasi

Bahan	Formulasi							Fungsi	
	F1	F2	F3	F4	F5	K-	K-		K+
Ekstrak 75% Daun Salam (g)	1	0,67	1,33	2	-	-	Aqua des	Klindamisin	Bahan aktif
Ekstrak 75% Lidah Buaya (g)	1	1,33	0,67	-	2	-			Bahan aktif
Carbopol (g)	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75		1,75	<i>Gelling agent</i>
TEA (g)	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75		1,75	<i>pH adjuster</i>
Propilen Glikol (g)	10	10	10	10	10	10		10,0	Humektan
Metil Paraben (g)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18		0,18	Pengawet
Natrium Metabisulfat (g)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40		0,40	Antioksidan
Aquades (mL) ad	100	100	100	100	100	100		100	Pelarut

Keterangan:

- F1 : Kombinasi Ekstrak Daun Salam dan Lidah Buaya 1:1
- F2 : Kombinasi Ekstrak Daun Salam dan Lidah Buaya 1:2
- F3 : Kombinasi Ekstrak Daun Salam dan Lidah Buaya 2:1
- F4 : Ekstrak Daun Salam Tunggal
- F4 : Ekstrak Lidah Buaya Tunggal
- K- : Kontrol Negatif
- K+ : Kontrol Positif

3.9.2 Prosedur Pembuatan Sediaan

1. Pembuatan Ekstrak Daun Salam

Daun salam yang akan digunakan dicuci dengan air mengalir untuk hilangkan kotoran, lalu keringkan dengan oven suhu rendah 40-50 °C selama 2-4 hari hingga kering. Blender daun salam yang sudah kering sampai menjadi serbuk dan kemudian diayak. Melakukan maserasi dengan mencampurkan serbuk simplisia ke dalam pelarut etanol 70%, lalu masukkan wadah toples dan ditutup menggunakan aluminium foil. Maserasi dilakukan selama 3x24 jam, pengadukkan dilakukan sesekali dalam sehari. Ampas dipisahkan menggunakan kertas saring. Ampas kemudian ditambahkan ke larutan etanol 70%, ditutup dengan aluminium

foil, dan dibiarkan selama dua hari dengan sesekali diaduk. Setelah dua hari, filtrat disaring menggunakan kertas saring dan dicampur dengan filtrat yang pertama dan dievaporasi. Masukkan filtrat daun salam yang diperoleh kedalam labu alat *rotary evaporator*, lalu dipasangkan ke alat *rotary evaporator* pada suhu 60 °C dengan kecepatan 80 rpm kemudian dilanjutkan dengan proses penguapan pada *waterbath* untuk menguapkan sisa pelarut yang masih tersisa hingga didapatkan ekstrak kental daun salam. Setelah mendapatkan ekstrak kental yakni melakukan perhitungan rendemen menurut Arsyad *et al*, (2023) dengan rumus:

$$\text{Rendemen(\%)} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental (g)}}{\text{Berat Simplicia Kering (g)}} \times 100\%$$

2. Pembuatan Ekstrak Lidah buaya

Lidah buaya yang akan digunakan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan lendir-lendir kuning, lalu dikupas untuk memisahkan antara kulit dan daging lidah buaya, potong-potong daging lidah buaya menjadi lebih kecil agar mudah untuk diblender, kemudian blender daging lidah buaya untuk mendapatkan sari lidah buaya, selanjutnya disaring menggunakan kain bersih, simpan sari lidah buaya kedalam wadah bersih dan kedap udara, tutup wadah untuk menghindari oksidasi dan mengurangi resiko kontaminasi (Kalyan *et al.*, 2023).

3. Pembuatan Gel topikal

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b. Menimbang carbopol 1,75 g, lalu masukkan mortir dan tambahkan aquades diamkan 15 menit sampai mengembang, apabila udah mengembang aduk perlahan, sisihkan.
- c. Menimbang metil paraben 0,18 g dan propilen glikol 10 g, lalu dicampurkan ke dalam beaker glass ad homogen.
- d. Mengukur natrium metabisulfat, lalu masukkan ke *beaker glass* + sedikit aquades, aduk sampai homogen.
- e. Mencampurkan larutan natrium metabisulfat ke campuran metil paraben dan propilen glikol, aduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen.
- f. Lalu masukkan sedikit demi sedikit ekstrak daun salam dan lidah buaya sesuai formulasi

- 1) Formulasi F1 (1:1), ekstrak daun salam 1 g + ekstrak lidah buaya 1 g
- 2) Formulasi F2 (1:2), ekstrak daun salam 0,67 g + ekstrak lidah buaya 1,33 g
- 3) Formulasi F3 (2:1), ekstrak daun salam 1,33 g + ekstrak lidah buaya 0,67 g
- 4) Formulasi F4, ekstrak daun salam 2 g
- 5) Formulasi F5, ekstrak lidah buaya 2 g

Kemudian aduk perlahan sampai homogen.

- g. Masukkan campuran bahan aktif (f) dengan bahan eksipien lainnya (e) ke dalam carbopol yang telah mengembang, aduk perlahan ad homogen
- h. Tambahkan TEA 1,75 g untuk menetralkan pH sediaan gel yaitu 4,5-6,8, masukkan sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai homogen dan membentuk gel.
- i. Tambahkan sisa aquades hingga ad 100 g, aduk ad homogen

3.9.3 Evaluasi Sediaan

a. Uji Organoleptik

Gel kombinasi ekstrak etanol daun salam dan lidah buaya diamati bentuk, warna, dan baunya.

b. Uji Daya Sebar

Timbang 0,5 gram gel kombinasi dari ekstrak etanol daun salam dan lidah buaya, kemudian letakkan di tengah kaca arloji. Himpit kaca arloji tersebut dengan bagian kaca arloji satunya lagi. Kemudian diletakkan 200 gram beban dan tunggu lima menit. Lalu ukur diameter daya sebar menggunakan jangka sorong atau penggaris. Gel dengan daya sebar yang baik antara 5 cm - 7 cm (Wahidah *et al.*, 2024)

c. Uji Daya Lekat

Gel kombinasi dari ekstrak etanol daun salam dan lidah buaya sebanyak 0,1 g ditempatkan di antara dua object glass pada alat pengujian. Beban seberat 200 g elma 5 menit kemudian dilepaskan, dan waktu hingga kedua *object glass* terpisah dicatat. Gel dengan daya lekat yang baik 4 detik (Tasman *et al.*, 2023).

d. Pemeriksaan pH

Pengukuran pH dilakukan dengan pH meter yang telah dikalibrasi sebelumnya. Menimbang 1 g sediaan gel, lalu dilarutkan ke dalam 30 mL aquades.

Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam sediaan gel yang telah dilarutkan, kemudian pengukuran diulang sebanyak 3 kali untuk memperoleh hasil yang akurat pH ideal untuk sediaan gel yaitu 4,5-6,8 (Iskandar *et al.*, 2021).

e. Homogenitas

Pengujian dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan pada kaca arloji, sehingga sediaan uji menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Ansong *et al.*, 2023).

f. Viskositas

Viskositas adalah ukuran kekentalan suatu sediaan yang menunjukkan ketahanannya terhadap aliran, dan untuk sediaan gel nilai viskositas yang baik berkisar antara 50-250 dPa.s (Rashati *et al.*, 2024)

3.10 Uji Aktivitas Antibakteri

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat diawali dengan mencuci dan mengeringkan alat yang digunakan, lalu membungkusnya dengan kertas payung atau aluminium foil. Dilanjutkan dengan memasukkan alat ke dalam *autoclave* dengan suhu 121 °C, tekanan 1 atm dan selama 15 menit.

Sterilisasi bahan berupa media yang sudah dilarutkan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, dengan mulut erlenmeyer disumbat menggunakan gulungan kasa dan di *wrap* menggunakan plastik *wrap*, Dilanjutkan dengan memasukkan alat ke dalam *autoclave* dengan suhu 121 °C, tekanan 1 atm dan selama 15 menit.

2. Pembuatan Media

a. Media *Nutrient Agar* (NA)

Menimbang Media *Nutrient Agar* (NA) untuk dibuat pada 2 tabung reaksi yang setiap tabungnya berisikan 7,5 mL media NA, maka media yang dibutuhkan 0,42 gram kemudian dilarutkan dalam 15 mL aquades (28 g/L *Oxoid*). Panaskan menggunakan *hot plate* sambil diaduk dengan magnetic stirrer hingga larutan bening. Masukkan larutan ke tabung reaksi, tutup dengan kapas dan kasa steril. Sterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Letakkan tabung dengan posisi kemiringan $\pm 45^\circ$ dan tunggu hingga media

memadat. Inkubasi media padat pada suhu 37°C selama 1x24 jam untuk cek kontaminasi.

b. *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Menimbang bahan *Mueller Hinton Agar* (MHA) untuk dibuat pada 8 cawan petri yang setiap cawan petri berisikan 20 ml media *Mueller Hinton Agar* (MHA), maka media yang dibutuhkan 6,08 gram dan larutkan dalam 160 mL aquades (38 gram/L *Oxoid*). Panaskan menggunakan *hot plate* dengan pengadukan *magnetic stirrer* hingga larutan bening. Sterilisasi larutan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Tuangkan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ke dalam cawan petri, tunggu hingga memadat. Inkubasi media padat pada suhu 37 °C selama 1x24 jam untuk cek kontaminasi.

c. Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri *Stapylococcus epidermidis* dilakukan dengan mengambil satu ose biakan murni menggunakan ose steril, kemudian digoreskan pada agar miring *Nutrient Agar* (NA) secara silang atau zig-zag lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil satu ose bakteri *Stapylococcus epidermidis* yang sudah diremajakan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi 10 mL larutan NaCl fisiologis 0,9% steril. Selanjutnya, dihomogenkan menggunakan *vortex*, lalu dibandingkan dengan larutan standar *Mc Farland* 0,5 untuk memastikan kekeruhan setara dengan konsentrasi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

3. Pembuatan Larutan Kontrol

Penelitian ini kontrol negatif menggunakan basis dari formulasi sediaan gel dan aquades yang disterilkan, sedangkan larutan kontrol positif menggunakan antibiotik klindamisin 0,8% yang dibuat dengan cara menimbang sebanyak 0,8 gram krim dan dilarutkan dengan aquades 10 mL pada labu ukur, kemudian aduk hingga homogen.

4. Penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM)

Penentuan KHM tahap awal yang dilakukan mencakup pembuatan larutan stok dari ekstrak tunggal daun salam (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) Walp) dan lidah buaya (*Aloe vera*) dengan variasi konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, dan 75%, dan juga kontrol positif klindamisin 0,8%, kontrol negatif aquades steril. Berikutnya membuat media *Mueller Hinton Agar* (MHA) untuk 6 cawan petri dengan masing-masing petri berisikan 20 mL. Siapkan suspensi bakteri uji, yaitu *Staphylococcus epidermidis*, dengan kepadatan yang telah distandarisasi menggunakan standar *McFarland* 0,5. Langkah selanjutnya menyebarkan suspensi bakteri ke dalam media *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan teknik *swap* yakni dengan menyelupkan *cotton swap* kedalam suspensi bakteri, kemudian aplikasikan ke media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan meratakan ke setiap sisi seluruh permukaan media dalam cawan petri, setelah itu membuat sumuran ke media yang dimana dalam satu cawan petri berisi 3 konsentrasi yang berbeda. Masukkan larutan ekstrak yang telah dibuat ke dalam sumuran dengan menggunakan mikro pipet, inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam.

Pasca-inkubasi, amati setiap cawan petri untuk mendeteksi adanya pertumbuhan bakteri, yang ditandai dengan tidak adanya zona hambat yang terbentuk pada sisi sumuran, bandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif, yang diharapkan menunjukkan pertumbuhan bakteri sehingga media menjadi keruh atau tidak adanya zona hambat. KHM didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari sampel uji yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri (media tetap bening, serupa dengan kontrol positif). Pembuatan variasi konsentrasi yang berbeda ini berfungsi sebagai prosedur pendahuluan atau uji awal, yang selanjutnya dimanfaatkan untuk menetapkan konsentrasi pembandingan dalam larutan kombinasi. Dari variasi konsentrasi tersebut, dipilih satu konsentrasi yang mencapai KHM. Larutan dengan konsentrasi hambat minimum (KHM) ini kemudian akan dikembangkan dalam skala perbandingan untuk pengujian kombinasi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) Walp) dan lidah buaya (*Aloe vera*).

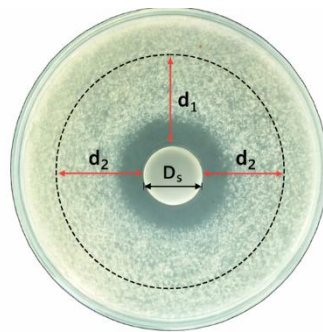
5. Pengujian Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi sumuran dilakukan dengan *spread plate* menggunakan teknik *swap* yakni dengan menyelupkan *cotton swap* kedalam suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis*, diratakan ke seluruh permukaan menggunakan alat *cotton swap*, tunggu hingga suspensi bakteri meresap ke dalam media selama ± 5 menit. Membuat lubang atau sumuran pada media agar *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan menggunakan alat *cork borer*, kemudian masukkan sediaan gel dengan kombinasi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) Walp) dan ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*) didalam lubang atau sumuran media agar *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah diinokulasikan bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

Inkubasi cawan petri dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 1x24 jam. Hasil dari proses inkubasi selama 1x 24 jam dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat dihitung dari tepi area zona bening ke tepi lainnya melalui titik tengah lubang atau sumuran dan pengukurannya dilakukan secara dua arah yakni horizontal dan vertikal. Apabila tidak terdapat zona hambat disekitar lubang atau sumuran, maka dinyatakan diameter zona hambatnya adalah 0 mm. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya.

3.11 Metode Analisis Data

Zona hambat (*inhibition zone*) adalah parameter utama dalam uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis*, bakteri Gram-positif. Metode analisis umumnya melibatkan pengujian *in vitro* menggunakan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA), dimana sampel sediaan gel dengan kandungan kombinasi ekstrak daun salam dan ekstrak lidah buaya ditempatkan pada difusi sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Diameter zona bening di sekitar sampel diukur menggunakan jangka sorong (*caliper*) dalam satuan milimeter (mm), dan hasil dikategorikan sebagai lemah (<10 mm), sedang (10-20 mm), atau kuat (>20 mm) berdasarkan standar CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Rumus dari perhitungan rata-rata diameter zona hambat menurut Aprilia dkk. (2022):



Gambar 3. 1 Diagram Zona Hambat

$$D = \frac{(D_1 + D_2)}{2} - D_{\text{sumuran}}$$

Keterangan:

D_1 = Diameter vertikal

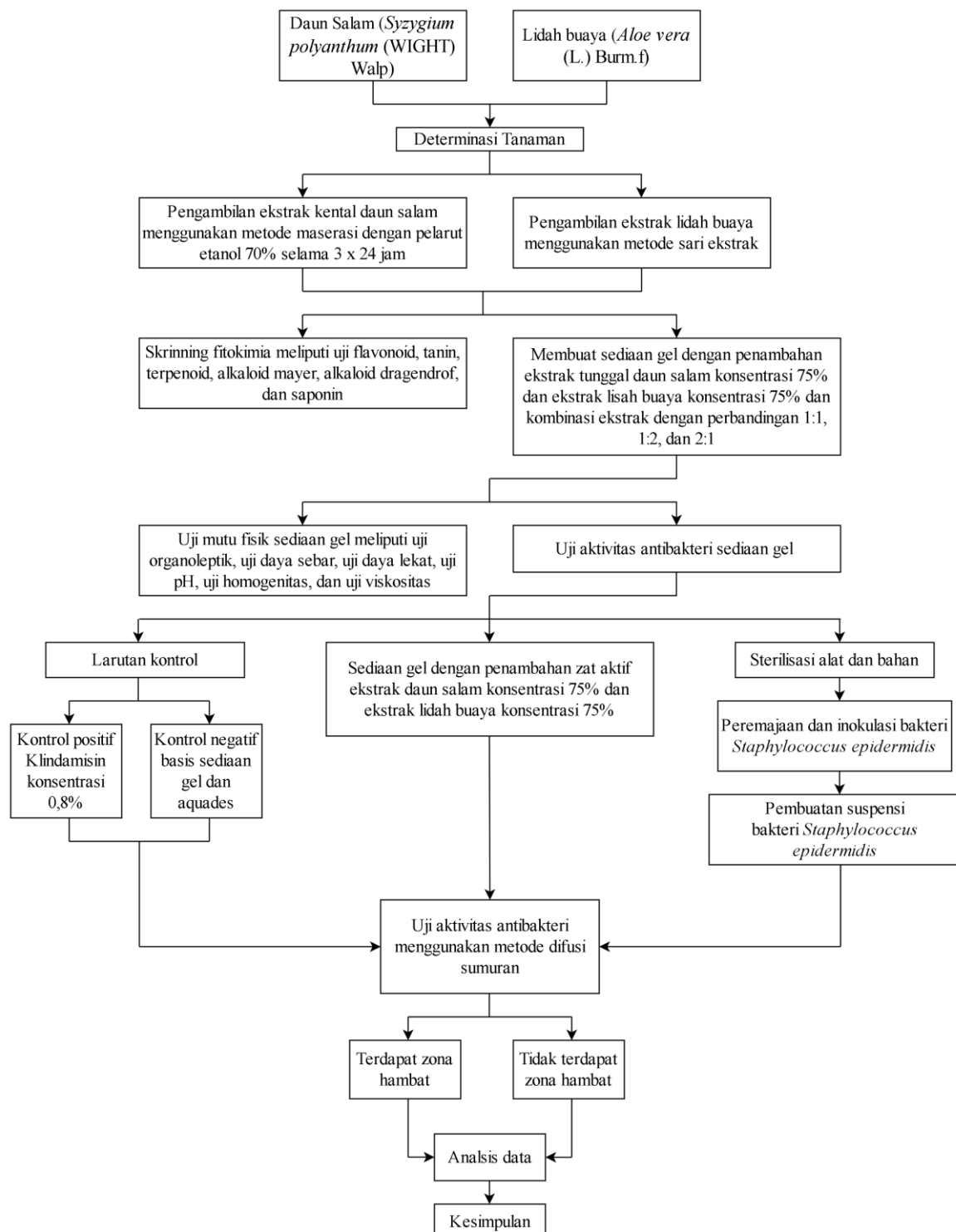
D_2 = Diameter horisontal

D_s = Diameter sumuran

3.12 Analisis Data

Data hasil pengujian aktivitas antibakteri daun salam dan lidah buaya terhadap diameter daerah hambat akan dianalisis secara statistik menggunakan pengujian non-parametrik *Kruskal-Willis* dengan *software Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) versi 26. Menurut Rozi *et al*, (2022), uji statistik non-parametrik seperti *Kruskal-Willis* yakni jenis pengujian statistik yang tidak membutuhkan adanya asumsi normalitas mengenai distribusi data populasi, berbeda dengan pengujian statistik parametrik yang membutuhkan asumsi spesifik, terutama data yang harus berdistribusi normal, uji non-parametrik cocok digunakan untuk menganalisis data dengan skala ordinal dan juga nominal, yang dimana jenis data tersebut umumnya tidak mengikuti distribusi normal, sedangkan uji *Kruskal-Willis* merupakan salah satu metode non-parametrik yang digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan antara kelompok variabel independen terhadap variabel dependen.

3.13 Kerangka Kerja Penelitian



Bagan 3. 2 Kerangka Kerja