

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian dengan metode eksperimental murni menggunakan desain *Post-test Only Control Group Design*. Pada desain penelitian ini melibatkan dua kelompok yaitu kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, yang dimana kelompok eksperimen merupakan kelompok yang akan diberikan intervensi, dalam hal ini berupa kombinasi ekstrak dengan berbagai konsentrasi. Kelompok lainnya yaitu kelompok kontrol yang merupakan kelompok yang tidak diberikan perlakuan. Penelitian ini menggunakan metode difusi cakram untuk mengetahui aktivitas antibakteri pada ekstrak Tunggal dan ekstrak kombinasi daun afrika (*Vernonia amigdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan April – Juli 2026.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Terpadu dan Mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang pada bulan April – Juli 2026.

3.3 Bahan dan Alat

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

- | | | |
|------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| 1. Gunting | 13. <i>Hotplate</i> | 25. <i>Magnetic stirrer</i> |
| 2. Oven | 14. Gelas arloji | 26. <i>Vortex</i> |
| 3. Blender | 15. Sabun steril | 27. Jangka sorong |
| 4. Ayakan mesh 40 | 16. Cawan petri | 28. Penggaris |
| 5. Timbangan analitik | 17. Labu erlenmeyer | 29. Kertas cakram |
| 6. Toples kaca (botol gelap) | 18. Gelas ukur | 30. Lemari pendingin |
| 7. pengaduk | 19. Gelas takar | 31. Bunsen |
| 8. Kain flanel | 20. Kertas samson | 32. Rak tabung reaksi |
| 9. <i>Rotary evaporator</i> | 21. Alumunium foil | 33. Corong kaca |

- | | | |
|-----------------------|---------------|-----------------------------|
| 10. <i>Water bath</i> | 22. Autoklaf | 34. Bunsen |
| 11. Tabung reaksi | 23. Jarum ose | 35. Sendok <i>Stainlees</i> |
| 12. Kertas saring | 24. Pinset | 36. Sendok tanduk |

3.3.2 Bahan

Dalam penelitian ini bahan yang dipakai yaitu:

- | | | |
|-------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| 1) Ekstrak daun afrika | 7) HCl pekat | 13) Media NA |
| 2) Ekstrak daun kemangi | 8) HCl 2 N | 14) Media MHA |
| 3) Etanol 70% | 9) Air hangat | 15) Media NB |
| 4) Reagen wegner | 10) NaOH 10% | 16) <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 5) Reagen mayer | 11) Aquadest | 17) NaCl fisiologis |
| 6) Reagen dragendorff | 12) Larutan
fericlorida 1% | 18) Kloramfenikol 250
mg |
| | | 19) Metanol |

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi

Populasi merupakan wilayah generalisasi yang terdiri atas objek/subjek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya. Populasi yang diteliti adalah tanaman kemangi (*Ocimum sanctum*) yang didapat dari Kota Malang dan daun afrika (*Vernonia amygdalina*) yang diperoleh dari Desa Kendalpayak, Kec.Pakisaji, Kabupaten Malang, Jawa Timur. Populasi kultur murni *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang.

3.4.2 Sampel penelitian

Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik individu yang dimiliki oleh populasi. Sampel yang baik memiliki sifat representatif terhadap populasi. Sampel yang dipakai dalam penelitian yaitu daun kemangi dari Kota Malang dan daun afrika yang diambil dari Desa Kendalpayak, Kec.Pakisaji, Kabupaten Malang, Jawa Timur. Bakteri yang dipakai dalam penelitian ini yaitu *Staphylococcus aureus*.

1. Kriteria Inklusi

a. Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)

Memiliki daun berwarna hijau tua hingga hijau muda, berbentuk lanset dengan tepi bergerigi dan ujung runcing, daun utuh tanpa cacat fisik seperti sobekan atau bercak cokelat/hitam, daun yang bebas dari kutu dan jamur seperti adanya bercak putih, ukuran panjang 15-25 cm dan lebar 5-8 cm.

b. Daun Kemangi (*Ocimum Sanctum*)

Memiliki daun segar berwarna hijau muda hingga tua, permukaan halus tanpa bercak kuning atau busuk, tidak layu atau berlendir, berbentuk oval atau bulat telur dengan permukaan rata atau sedikit bergelombang.

2. Kriteria Eksklusi

a. Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)

Daun yang kering, berwarna kuning kecoklatan, daun yang sudah layu, terdapat hama atau bekas dan terbang maupun robek.

b. Daun Kemangi (*Ocimum Sanctum*)

Daun yang kering, berwarna kuning kecoklatan, terdapat hama atau bercak putih dan berubang maupun robek.

3.5 Identifikasi Variabel

3.5.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (terikat) (Hikmah, 2020). Dalam penelitian ini, variabel bebas yang digunakan adalah kombinasi ekstrak etanol 70% daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) dan daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) pada konsentrasi 25%, 50%, dan 75% yang dibuat dalam perbandingan seperti pada tabel 2.7. Kombinasi ekstrak tersebut diberikan sebagai perlakuan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode difusi cakram (*Disk diffusion method*).

Tabel 3. 1 Perlakuan Perbandingan Konsentrasi

Sampel	Daun kemangi (<i>Ocimum sanctum</i>)			
Daun afrika (<i>Vernonia amygdalina</i>)		25%	50%	75%
	25%	25%:25%	25%:50%	25%:75%
	50%	50%:25%	50%:50%	50%:75%
	75%	75%:25%	75%:50%	75%:75%

3.5.2 Variabel Terikat (*Dependent*)

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas (Hikmah, 2020). Penelitian ini menggunakan variabel terikat yaitu zona hambat dan luas zona hambat yang terbentuk akibat pemberian perlakuan kombinasi ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Zona hambat ini bisa dilihat sebagai lingkaran bening di sekitar cakram kertas yang sudah direndam ekstrak, dimana bakteri tidak bisa tumbuh karena adanya senyawa aktif dari kedua daun tersebut.

3.5.3 Variabel Terkontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga hubungan variabel independen terhadap dependen tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti (Hikmah, 2020). Pada penelitian ini variabel terkontrol meliputi proses ekstraksi yang dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% sebagai standar penarikan senyawa bioaktif dari daun Afrika dan daun kemangi, dengan lama maserasi 3×24 jam serta suhu penguapan ekstrak pada 50 °C. Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah Mueller Hinton Agar (MHA) untuk uji aktivitas antibakteri dan Nutrient Agar (NA) untuk peremajaan bakteri. Inkubasi bakteri dilakukan tepat selama 1x24 jam pada suhu inkubator 37 °C agar pertumbuhan koloni optimal dan zona hambat terlihat jelas.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3. 2 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala	Parameter
Daun Afrika (<i>Vernonia amygdalina</i>)	Daun Afrika (<i>Vernonia amygdalina</i>) berbentuk lanset, berwarna hijau, dengan tepi halus dan permukaan kasar. Daun-daun ini dikeringkan, digiling, dan digunakan sebagai bahan uji untuk aktivitas antibakteri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> .	Pengamatan visual, timbangan analitik	Ordinari	Daun berwarna hijau, segar, tidak layu, tidak berlubang, ukuran 15-25 cm
Daun Kemangi (<i>Ocimum sanctum</i>)	Daun kemangi (<i>Ocimum sanctum</i>) berbentuk oval dengan ujung runcing, berwarna hijau muda hingga hijau tua, memiliki aroma khas, dan	Pengamatan visual, timbangan analitik	Ordinari	Daun segar berwarna hijau, tidak rusak, tidak ada bercak putih, ukuran 4-6 cm

	permukaan halus berbulu dengan trikoma kelenjar. Daun kemangi dikeringkan dan diekstraksi untuk menguji aktivitas antibakterinya, baik secara terpisah maupun dalam kombinasi dengan daun afrika (<i>Vernonia amygdalina</i>)			
Maserasi	Proses ekstraksi simplisia daun afrika dan daun kemangi dengan cara perendaman menggunakan pelarut etanol 70% selama 3 x 24 jam pada suhu ruang dengan pengadukan berkala untuk menarik senyawa bioaktif.	Gelas ukur, timbangan analitik	Rasio	Perbandingan simplisia: pelarut (1:5 w/v), lama maserasi 3 x 24 jam, pelarut etanol 70%

Kombinasi Ekstrak	Campuran ekstrak etanol 70% daun afrika dan daun Kemangi dengan perbandingan konsentrasi tertentu yang digunakan sebagai perlakuan dalam uji antibakteri.	Timbangan analitik, gelas ukur	Rasio	konsentrasi 25%, 50%, dan 75% yang dibuat dalam perbandingan konsentrasi seperti tabel 2.7
<i>Staphulococcus aureus</i>	Bakteri Gram positif berbentuk kokus yang digunakan sebagai mikroorganisme uji dalam penelitian.	Standar McFarland 0,5	Nominal	Kepadatan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL
Aktivitas antibakteri	Kemampuan kombinasi ekstrak dalam menghambat pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar cakram pada media MHA.	Jangka sorong	Rasio	Diameter zona hambat (mm) setelah inkubasi 24 jam pada 37 °C

Zona hambat	Area bening di sekitar cakram kertas yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri.	Jangka sorong	Rasio	Ukuran diameter zona hambat dalam milimeter (mm)
-------------	--	---------------	-------	--

3.7 Metode Analisis Data dan Prosedur Penelitian

3.7.1 Metode Analisis Data

1. Zona hambat dan Perbandingan

Metode analisis zona penghambatan dalam pengujian aktivitas antibakteri ekstrak tunggal dan kombinasi daun *Vernonia amygdalina* (daun Afrika) dan daun *Ocimum sanctum* (daun kemangi) terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan mengukur diameter zona penghambatan yang terbentuk di sekitar *disk* ekstrak menggunakan penggaris dalam milimeter setelah inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Proses inksubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C merupakan waktu dan suhu yang ideal untuk pertumbuhan bakteri (Sarijowan *et al.*, 2022).

Menurut David dan Stout (1971), klasifikasi daya antibakteri suatu agen atau ekstrak tanaman dapat ditentukan berdasarkan pengukuran diameter zona penghambatan yang terbentuk pada metode difusi agar terhadap bakteri uji, dengan kategori sebagai berikut : Zona penghambatan lebih dari 20 mm menunjukkan aktivitas antimikroba yang sangat kuat, kuat untuk zona penghambatan dari rentang 10-20 mm, sedang untuk zona penghambatan 5-10 mm, dan lemah untuk zona penghambatan kurang dari 5 mm (Safitri *et al.*, 2017).

4 2026 (Kasanah *et al.*, 2026)

4.7.1 Prosedur Penelitian

1. Determinasi Sampel

Uji ini dilakukan sebelum persiapan bahan obat mentah untuk memastikan bahwa tanaman yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun afrika (*Vernonia amygdalina*) daun kemangi (*Ocimum sanctum*) Penentuan dilakukan di Laboratorium Materia Medica di Batu, Malang, Jawa Timur.

2. Pengolahan Sampel

Sampel terdiri dari daun Afrika (*Vernonia amigdalina*) dan daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) yang dipetik dan dipisahkan dari batangnya, kemudian disortir basah, dicuci dengan air mengalir, dan dikeringkan. Proses pengeringan daun afrika dan daun kemangi dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 50 °C. Sampel daun afrika dan daun kemangi yang dikeringkan digiling menggunakan blender dan kemudian dilakukan pengayakan dengan ayakan mesh 40 hingga diperoleh bubuk halus dengan ukuran partikel yang sama. Hasilnya kemudian ditimbang dan disimpan dalam wadah tertutup (Wijaya & Noviana, 2022).

3. Ekstraksi Daun afrika (*Vernonia Amigdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*)

Proses ekstraksi serbuk daun kemangi yaitu menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, perbandingan simplisia dengan pelarut adalah 1:5 berdasarkan perbandingan berat terhadap volume (w/v) selama 3 x 24 jam. wadah maserasi ditutup dan disimpan dalam botol warna gelap selama 24 jam terhindar dari paparan sinar matahari sambil diaduk, pengadukan dilakukan sehari sekali. Pengadukan dilakukan untuk menghomogenkan larutan selama proses perendaman dan mempercepat kontak antara pelarut dan sampel (Kasanah *et al.*, 2026). Larutan ekstraksi disaring dan diperas menggunakan kain flanel untuk memisahkan antara filtrat dan residu setelah 3x24 jam. Residu di remaserasi kembali dengan etanol 70% sebanyak 2 kali hingga larutan jernih. filtrat yang di peroleh kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan kecepatan 70 rpm kemudian dilakukan penguapan ekstrak dengan menggunakan *waterbath* untuk menguapkan sisa pelarut yang tersisa hingga diperoleh ekstrak yang kental. Ekstrak disimpan pada wadah kaca tertutup rapat dan terlindung dari paparan cahaya matahari

(Pujiastuti & El'Zeba, 2021). Timbang ekstrak setelah penguapan dengan mengurangi berat wadah kosong, lalu hitung hasil ekstrak (% berat/berat) menggunakan rumus (Purnamasari, 2021):

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{berat ekstrak kental (g)}}{\text{berat simplisia (g)}} \times 100 \%$$

Nilai rendemen dikatakan baik jika nilainya ≥ 10 (Subaryanti *et al.*, 2022).

4. Skrining Fitokimia Daun afrika (*Vernonia Amigdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*)

Simplisia dianalisis kandungan senyawa kimia dengan tes uji warna menggunakan beberapa pereaksi. Uji ini dilakukan untuk mengetahui keberadaan senyawa-senyawa alkaloid, saponin, kuinon, saponin, alkaloid dan flavonoid.

a. Uji saponin (Uji busa)

Ekstrak kental daun afrika (*Vernonia amigdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) yang dijadikan bahan ditimbang sebanyak 0,5 gr dan ditambahkan dengan air hangat serta dikocok vertikal selama ± 10 detik. Busa akan terbentuk dengan tinggi sekitar 1 – 3 cm selama 30 detik yang menunjukkan adanya saponin dalam bahan ekstrak, walaupun ditambahkan dengan 1 tetes HCl 2 N (Bintoro *et al.*, 2017).

b. Flavonoid

Ekstrak kental daun afrika (*Vernonia amigdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) sebanyak 2 ml sampel ditempatkan dalam tabung reaksi. Tambahkan 2-3 tetes larutan NaOH 10%. Jika hasilnya menunjukkan warna kuning, reaksi tersebut positif (Dj *et al.*, 2023).

c. Tanin

Ekstrak kental daun afrika (*Vernonia amigdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) diambil sebanyak 2 ml, tambahkan ke dalam 2 ml air suling. Larutan ekstrak ditetesi dengan 1-2 tetes larutan feriklorida 1%. Kandungan tanin ditunjukkan adanya warna hijau gelap (hijau kehitaman) atau hijau kebiruan (Emilia *et al.*, 2023).

d. Minyak Atsiri

Ekstrak kental 0,5 g diencerkan dengan pelarut etanol 70% 1 mL kemudian dipanaskan di *hotplate* di atas gelas arloji hingga diperoleh residu. Hasil positif minyak atsiri ditandai dengan bau khas yang dihasilkan oleh residu tersebut (Rukmini *et al.*, 2020).

5. Sterilisasi Alat dan Bahan

Prosedur sterilisasi alat penelitian dilakukan melalui proses pencucian yang menyeluruh menggunakan deterjen yang sesuai atau sabun steril, diikuti dengan pembilasan berulang menggunakan air mengalir yang bersih untuk menghilangkan sisa sabun secara menyeluruh, kemudian peralatan dikeringkan sempurna di udara terbuka atau dengan kain steril untuk mencegah kontaminasi mikrobiologis sebelum digunakan dalam proses ekstraksi, maserasi, remaserasi, atau skrining fitokimia pada ekstrak daun afrika (*Vernonia amigdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*). Alat-alat kaca seperti cawan Petri, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, gelas ukur, dan gelas takar dibungkus dengan kertas *samson* atau *aluminium* dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sementara itu, alat-alat logam seperti jarum inokulasi dan pinset disterilkan dengan merendamnya dalam alkohol dan kemudian memanaskannya di atas pembakar Bunsen (Rizki *et al.*, 2021).

6. Pembuatan Media

a. Media *Nutrient Agar* (NA)

Media *Nutrient agar* (NA) merk sebanyak 1,15 g dilarutkan dalam 50 ml *aquadest* (23 g/ 1000 ml) pada labu erlenmeyer dan dipanaskan diatas *hot plate* hingga mendidih sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* untuk memastikan media dapat tercampur merata. Media dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml dan ditutup dengan menggunakan *aluminium foil*, kemudian disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C untuk mencegah kemungkinan kontaminasi mikroba yang tidak dibutuhkan. Media yang sudah steril didiamkan pada suhu ruang selama ± 30 menit hingga memadat pada kemiringan 30° (Fatimawali & Lebang, 2022).

b. Media MHA

Pembuatan dilakukan dengan cara 38 g serbuk MHA dilarutkan dalam 1L *aquadest* pada Erlenmeyer dan diaduk hingga larut sambil dilakukan pemanasan diatas *hotplate* agar larutan homogen. Larutan kemudian disterilkan dalam autoklaf di suhu 121 °C selama 20 menit. Media MHA yang sudah steril di masukkan ke cawan petri dan didiamkan hingga memadat (Isnindar *et al.*, 2023).

c. Media *Nutrient Broth* (NB)

Pembuatan media *Nutrient Broth* (NB) dengan memasukkan 4 gr bubuk NB ke dalam labu Erlenmeyer kemudian diberi aquades sebanyak 700 ml. Selanjutnya dipanaskan dengan menggunakan hot plate sambil diaduk sampai larut. Kemudian diturunkan dari pemanas dan dibiarkan dalam beberapa menit. Setelah itu, permukaan mulut Erlenmeyer ditutupi dengan kapas dan aluminium foil, dan selanjutnya dimasukkan ke dalam autoclave untuk disterilisasi (Nikmah *et al.*, 2022).

d. Peremajaan Biakan Bakteri

Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan mengambil satu inokulum dari kultur murni, kemudian menyebarkannya pada medium agar dengan permukaan miring, dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam (Ningsih *et al.*, 2023).

e. Pembuatan Larutan Standar Mc Farland 0,5

Pembuatan larutan standar Mc Farland 0,5 dengan mencampurkan larutan BaCl₂ (1,175%) sebanyak 0,05 mL dan larutan H₂SO₄ (1%) sebanyak 9,95 mL. Dikocok menggunakan vortex hingga menjadi larutan keruh.

f. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi koloni *stapylococus aureus*, ambil satu koloni dari medium padat dan letakkan dalam tabung reaksi yang berisi 5 mL larutan natrium klorida fisiologis, lalu kocok hingga homogen. Selanjutnya, sesuaikan konsentrasinya dengan standar 0.5 McFarland (sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) (Rizki *et al.*, 2021).

g. Pembuatan Larutan Kontrol

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 3 kontrol positif yaitu kloramfenikol dan ekstrak tunggal dari masing-masing sampel. Kontrol negatif yang digunakan yaitu *aquadest*. Kontrol positif kloramfenikol dibuat dari sediaan obat kapsul kloramfenikol 250 mg. Satu kapsul kloramfenikol dibuka cangkang kapsulnya kemudian ditimbang serbuk dalam kapsul sebanyak 25 mg. Kemudian serbuk dimasukkan kedalam wadah botol kaca dan dilarutkan dengan metanol sebanyak 5 mL untuk memperoleh larutan stok kloramfenikol dengan konsentrasi 250 μ g/50 μ L (Nikmah *et al.*, 2022). Kontrol positif untuk daun afrika (*Vernonia amigdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dibuat berdasarkan dengan konsentrasi pada kombinasi ekstrak kedua tanaman tersebut yaitu 25%, 50% dan 75%.

h. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan KHM dilakukan dengan metode dilusi cair menggunakan perbandingan kombinasi ekstrak yang menghasilkan zona hambat paling besar. Nutrient Broth (NB) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan masing-masing 1 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan tabung reaksi tersebut diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37 °C. Konsentrasi terendah yang menunjukkan pertumbuhan bakteri terhambat ditandai dengan tidak adanya kekeruhan, maka konsentrasi tersebut ditetapkan sebagai konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) (Trisina *et al.*, 2024). Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak daun afrika (*Vernonia amigdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dilakukan melalui pengujian empat tingkat konsentrasi, yakni 5%, 10%, 15%, dan 20%. Setiap ekstrak ditimbang secara terpisah sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan, kemudian dilarutkan dalam 5 mL *aquadest*. Pada konsentrasi 5% digunakan 0,25 g ekstrak, 10% sebanyak 0,5 g ekstrak, 15% sebanyak 0,75 g ekstrak, serta 20% sebanyak 1 g ekstrak. Keempat larutan ekstrak tersebut akan dilakukan pengujian.

- i. Pembuatan Konsentrasi Kombinasi Ekstrak Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) dan Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*)

Konsentrasi daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) disiapkan menggunakan pelarut *aquadest*. Tiga macam perbandingan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% dibuat seperti pada tabel 3.3 dengan masing-masing konsentrasi dilarutkan dalam pelarut *aquadest* hingga mencapai volume total 5 ml. setiap konsentrasi kemudian direplikasi sebanyak tiga kali pengulangan.

Tabel 3. 3 Rasio Konsentrasi Ekstrak Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) dan Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*)

Rasio konsentrasi (%) ekstrak	Berat ekstrak (gram) dalam 5 ml
25 : 25	1,25 : 1,25
25 : 50	1,25 : 2,5
25 : 75	1,25 : 3,75
50 : 25	2,5 : 1,25
50 : 50	2,5 : 2,5
50 : 75	2,5 : 3,75
75 : 25	3,75 : 1,25
75 : 50	3,75 : 2,5
75 : 75	3,75 : 3,75

- j. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) diuji menggunakan metode difusi cakram kertas. Media MHA dituang ke dalam cawan petri steril (cawan gelas dengan garis tengah sekitar tiga inci) dan dibiarkan sampai menjadi padat. Media tersebut diinokulasi dengan bakteri uji dengan jarum ose pada permukaan atas media agar yang penuh dengan biakan bakteri. Kertas cakram steril dengan diameter 6 mm disiapkan, kemudian setiap cawan petri dibuat tiga cakram sebagai replikasi untuk satu kelompok uji, agar hasil zona hambat lebih akurat.

Cawan petri yang berisi media agar dan biakan bakteri dibuat menjadi 11 kelompok uji yang disajikan seperti pada tabel 3.4 :

Tabel 3. 4 Tabel Perlakuan Kelompok Uji

Kelompok Uji	Perlakuan
K1	Kombinasi 25% DA : 25% DK
K2	Kombinasi 25% DA : 50% DK
K3	Kombinasi 25% DA : 75% DK
K4	Kombinasi 50% DA : 25% DK
K5	Kombinasi 50% DA : 50% DK
K6	Kombinasi 50% DA : 75% DK
K7	Kombinasi 75% DA : 25% DK
K8	Kombinasi 75% DA : 50% DK
K9	Kombinasi 75% DA : 75% DK
K10	Kontrol negatif (aquadest)
K11	DA 25%
K12	DA 50%
K13	DA 75%
K14	DK 25%
K15	DK 50%
K16	DK 75%
K17	Kontrol positif (kloramfenikol)

Keterangan:

DA = Daun afrika (*Vernonia amigdalina*)

DK = Daun kemangi (*Ocimum sanctum*)

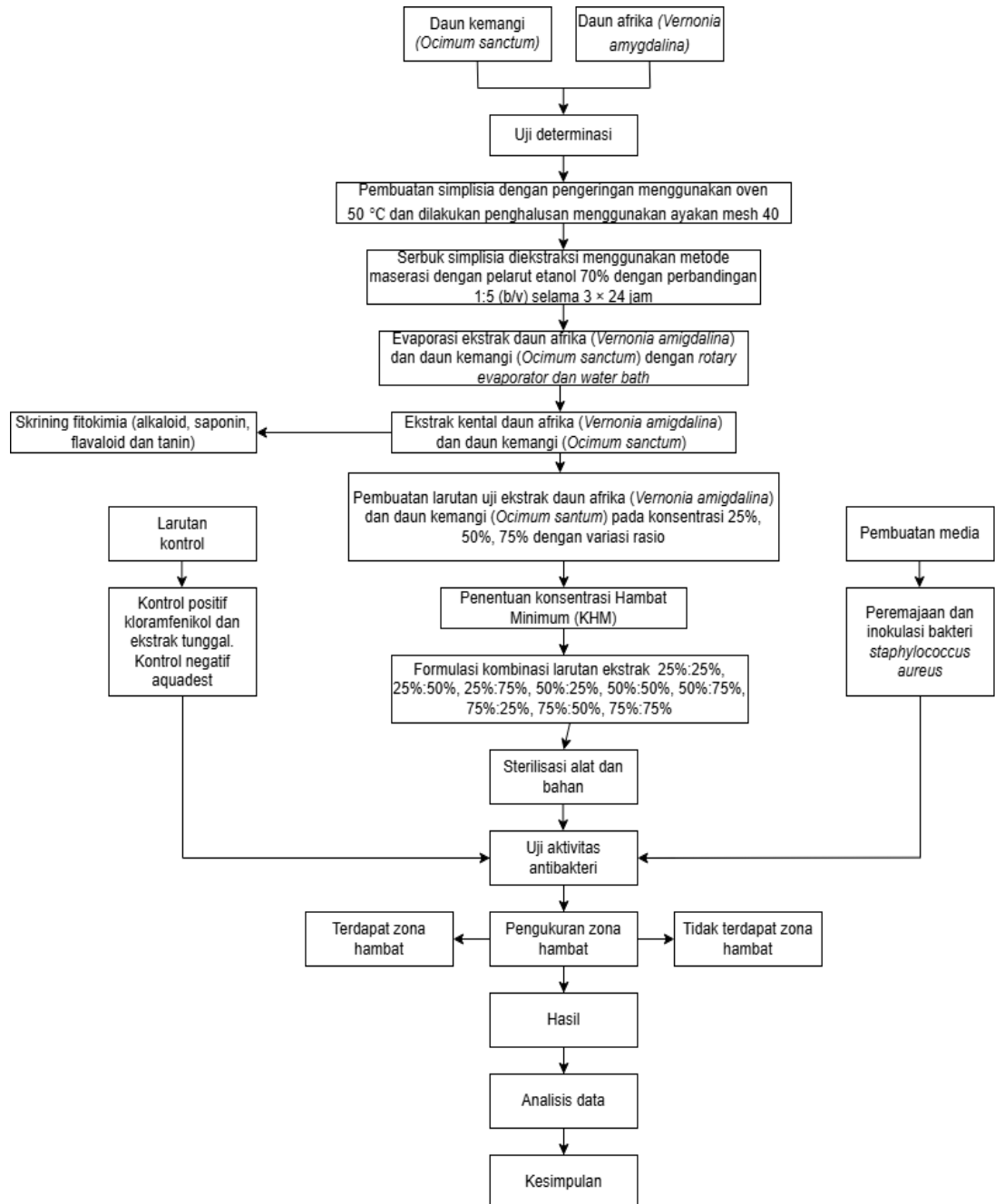
Pengujian ini dilakukan dengan cara, kertas cakram direndam dengan larutan ekstrak kemudian ditempatkan diatas permukaan media menggunakan pinset steril kemudian ditekan perlahan untuk memastikan kontak antara kertas cakram dan permukaan media. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, lalu hasil dari proses inkubasi dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Zona hambat diukur

dari tepi luar zona hambat hingga tepi yang bersebrangan melewati kertas cakram.

k. Analisis Data

Data hasil pengujian aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dan daun kemangi terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dianalisa secara statistik dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* (analisa varians satu arah) dengan program SPSS dengan taraf kepercayaan 95% atau $\alpha = 0,05$. Data awal tidak memenuhi uji homogenitas atau normalitas (Levene, $p < 0,05$), sehingga dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Duncan (Sarijowan *et al.*, 2022).

3.8 Kerangka Operasional



Bagan 3. 1 Kerangka Operasional