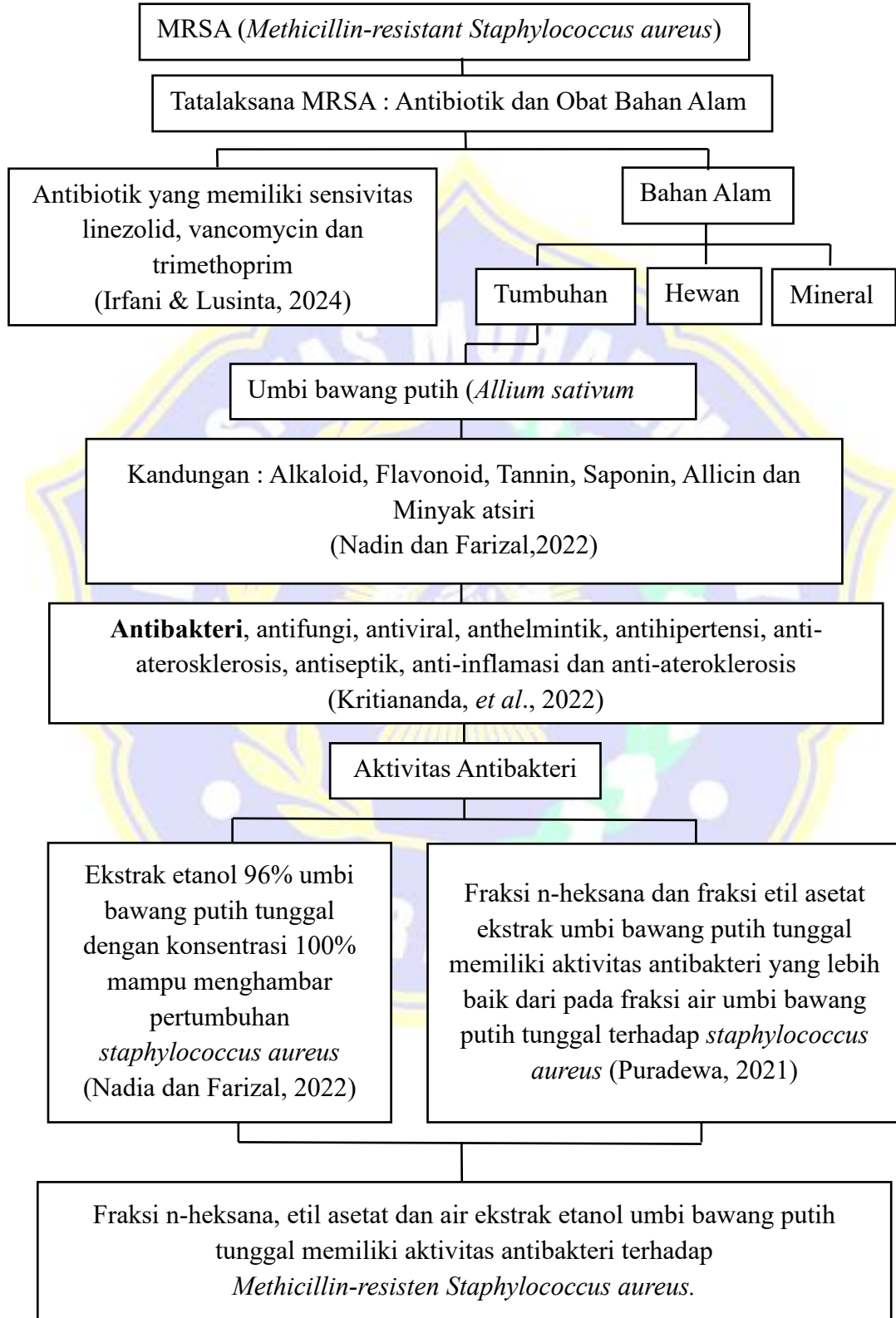


BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual



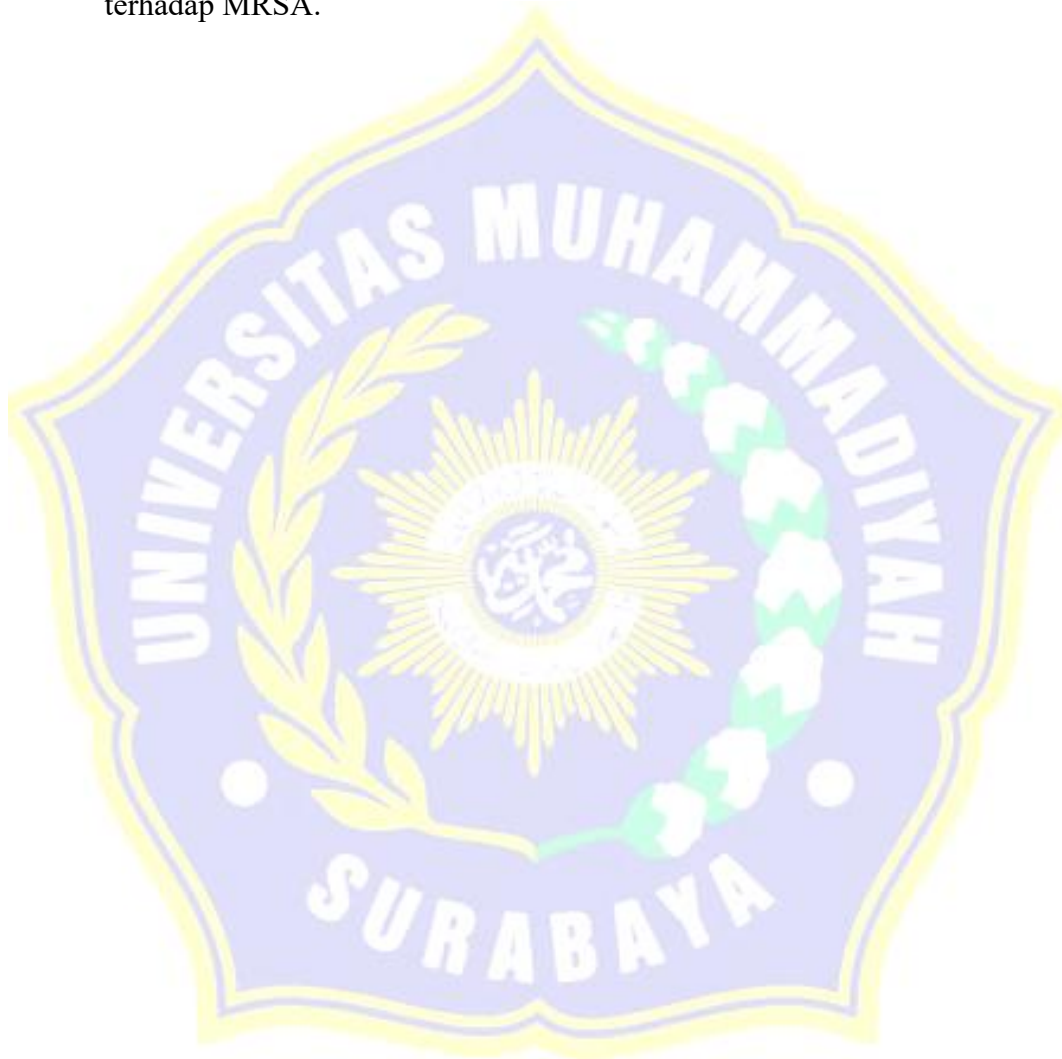
Uraian Kerangka Konsep :

Methicillin-resisten Staphylococcus aureus merupakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang mengalami resisten terhadap antibiotik golongan *methicillin* (Turner *et al.*, 2019). Upaya penanganan MRSA melibatkan strategi farmakologis dan non-farmakologis, serta penelitian ke arah alternatif alami. Secara farmakologis, meskipun antibiotik seperti vancomycin masih digunakan, keterbatasan efektivitas dan potensi resistensi mendorong pencarian senyawa lain (Irfani & Lusinta, 2024). Umbi bawang putih tunggal merupakan bawang khas yang tumbuh di beberapa wilayah Indonesia, termasuk Pulau Jawa. Bawang ini memiliki aroma lebih tajam dibandingkan bawang lain, yang menunjukkan kandungan senyawa aktif lebih tinggi. (Dina & Herrani, 2022). Hasil uji fitokimia yang dilakukan oleh (Pudiarifanti & Farizal, 2022) menunjukkan bahwa umbi bawang putih tunggal memiliki beberapa senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin yang dimana senyawa tersebut diduga memiliki potensi antibakteri. Umbi bawang putih tunggal memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Senyawa yang ada di dalamnya diketahui dapat bekerja sebagai antibakteri, antifungi, dan antiviral untuk melawan infeksi bakteri, jamur, dan virus. Selain itu, umbi bawang putih juga berfungsi sebagai anthelmintik untuk mengatasi cacingan, serta membantu menurunkan tekanan darah sehingga bersifat antihipertensi. Kandungan allicin dan senyawa sulfur di dalamnya juga bermanfaat sebagai anti-aterosklerosis untuk mencegah penyumbatan pembuluh darah. Tidak hanya itu, umbi bawang putih tunggal juga memiliki sifat antiseptik yang membantu penyembuhan luka dan anti-inflamasi yang dapat mengurangi peradangan, sehingga menjadikannya tanaman yang kaya manfaat bagi kesehatan tubuh (Kristiananda *et al.*, 2022). Pada penelitian sebelumnya pengujian umbi bawang putih tunggal telah dilakukan, ekstrak etanol 96% umbi bawang putih tunggal dengan konsentrasi 100% terbukti mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* (Pudiarifanti & Farizal, 2022). Selain itu, pada penelitian lain juga menunjukkan bahwa fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat dari ekstrak umbi bawang putih tunggal memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan fraksi air terhadap *Staphylococcus aureus* (Puradewa, 2021). Maka dari itu, penelitian kali ini menggunakan *Methicillin-resistant Staphylococcus*

aureus sebagai target uji sekaligus membandingkan aktivitas antibakteri antara fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air yang akan menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap MRSA

3.2 Hipotesis

1. Fraksi n-heksana, etil asetat dan air ekstrak etanol umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap MRSA.

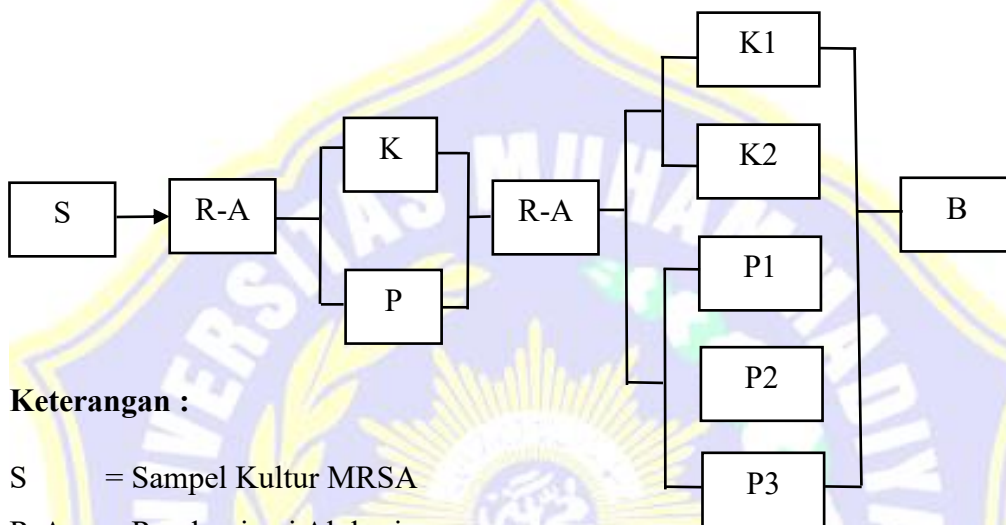


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *True experimental* dengan melakukan analisis pada Aktivitas antibakteri fraksi-fraksi Ekstrak Etanol 70% dan 96% umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) terhadap MRSA secara *in vitro*.



Keterangan :

- S = Sampel Kultur MRSA
- R-A = Randomisasi Alokasi
- K = Kontrol
- K1 = Kontrol Positif (Vancomysin)
- K2 = Kontrol Negatif (fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air)
- P = Perlakuan
- P1 = Fraksi n-heksana
- P2 = Fraksi etil asetat
- P3 = Fraksi air
- B = Aktivitas Antibakteri MRSA
- n = Replikasi

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya yang dilakukan pada bulan September 2025 – Februari 2026.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.4.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini ialah Sidoarjo Jawa Timur

4.4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini ialah Umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) yang dilakukan determinasi UPT Laboratorium Herba Material Medika Batu Malang, dan Isolat MRSA yang diperoleh dari Rumah Sakit Dr. Soetomo.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Klasifikasi Variabel

- 1) Variabel bebas : Variasi Fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air ekstrak etanol 70% dan 96% umbi bawang putih tunggal, vancomycin
- 2) Variabel Tergantung : Aktivitas Antibakteri, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), dan Rasio Potensi Terhadap MRSA dari Ekstrak Etanol Umbi bawang putih tunggal dengan variasi fraksi.
- 3) Variabel Kontrol : Alat, ruang kerja, sterilisasi media pertumbuhan, pH media, waktu inkubasi, kekeruhan suspensi bakteri, jarak sumuran, pembuatan inokulum MRSA, MHA

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) yang didapatkan dari *e-commerce* kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur. Nutrient Agar (Oxoid), NaCl p.a. (Merck), air suling, etanol p.a (Merck), n-heksana p.a. (Merck), etil asetat p.a. (Merck), air suling, vancomycin, asam klorida p.a (Merck) dan Kertas Saring.

4.5.2 Alat

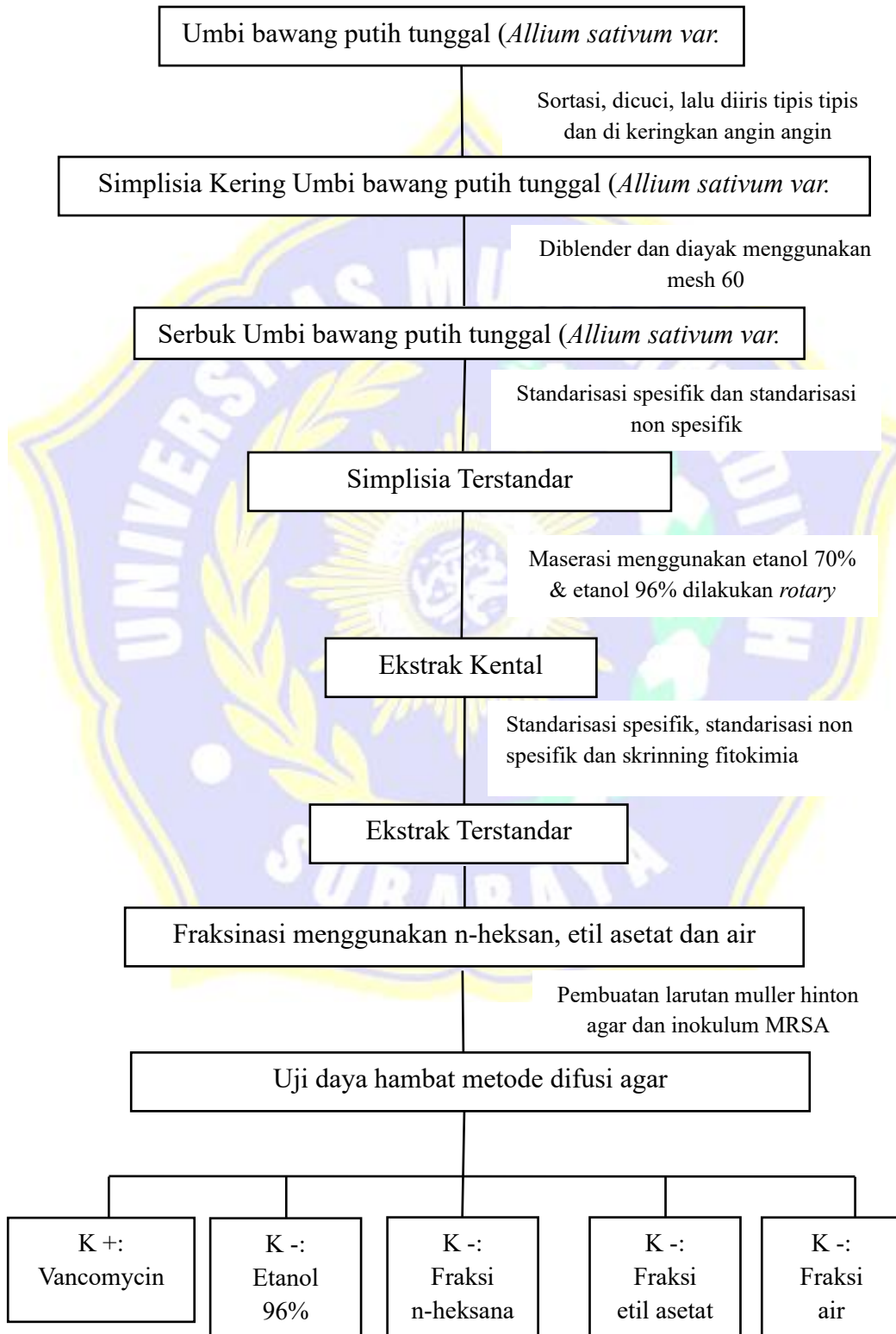
Alat yang digunakan dalam penelitian ini oven (NUVE), blender (Philips), mikropipet (Soccorex), rotary evaporator (HEIDOLPH Cat 561 01300-00), autoclave (HVE-50 cat HVE-50), pipet ukur (Iwaki- Pyrex®), cawan petri (pyrex), corong kaca (pyrex), gelas ukur (Pyrex), beaker glass (Pyrex), kaki tiga (no brand), labu Erlenmeyer (Pyrex), labu takar (Pyrex), pembakar spirtus (no brand), pinset (OneMed), rak tabung (Pudak), tabung reaksi (Iwaki-Pyrex®), timbangan analitik (ATY 224 R Shimadzu), Hotplate Stirrer (SP46925), Pencadang (no brand), jangka sorong (Mitutoyo), corong pisah (Iwaki) dan inkubator (Esco).

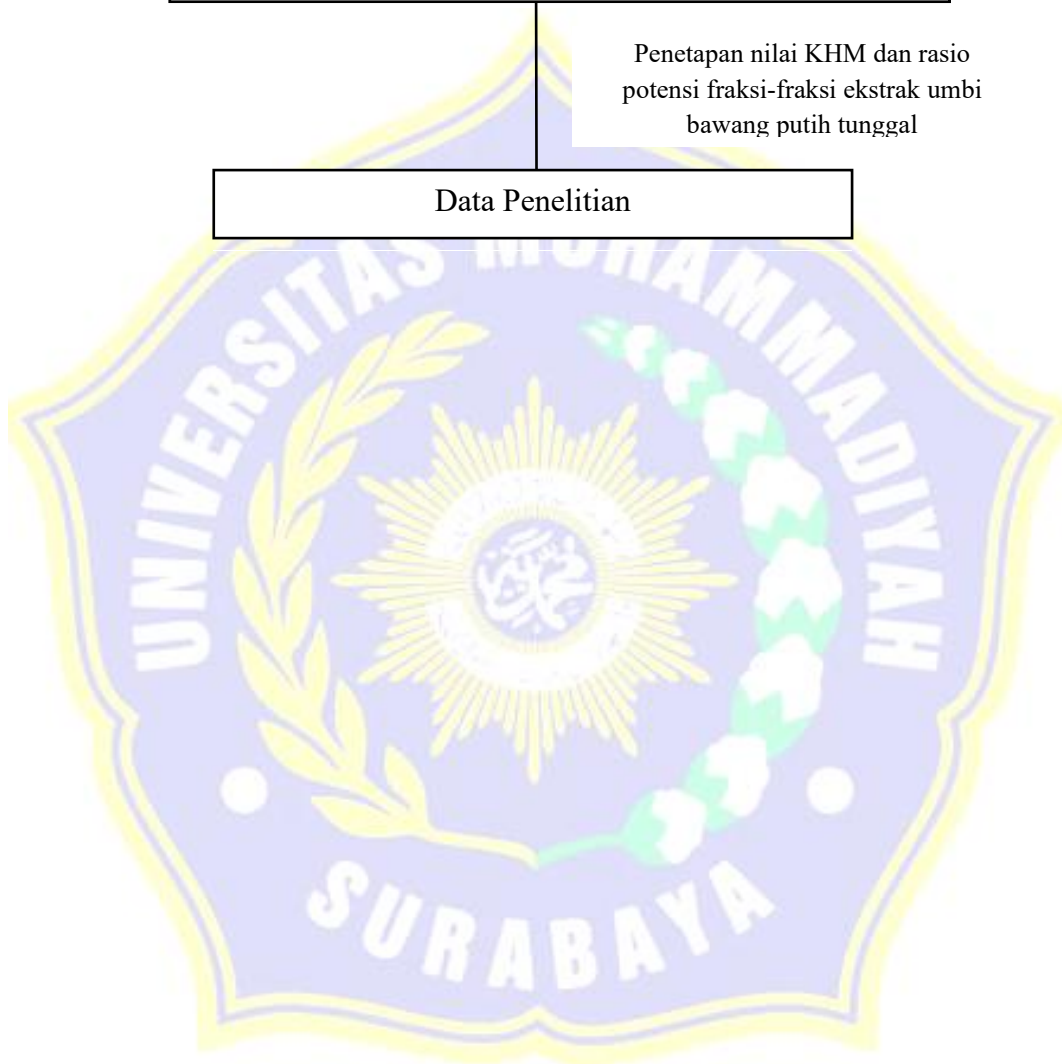
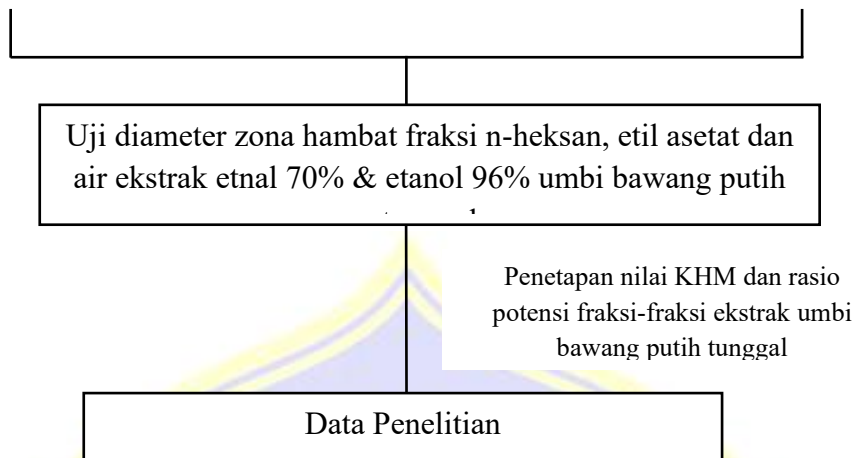
4.5.3 Definisi Operasional Variabel

1. Umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) yang didapatkan melalui pembelian lewat *e-commerce* Sidoarjo, Jawa Timur.
2. Ekstrak etanol merupakan hasil dari ekstraksi umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) yang diperoleh dengan metode maserasi.
3. Fraksinasi adalah suatu teknik pemisahan senyawa-senyawa dalam ekstrak berdasarkan tingkat kepolaran yang berbeda dari pelarut.
4. MRSA adalah bakteri gram positif yang didapatkan dari bentuk isolate stock dari Rumah Sakit Dr. Soetomo.
5. Daya antibakteri ini dapat dilihat pada Respon berupa efek hambatan terhadap pertumbuhan mikroba uji yaitu daerah bening (inhibition zone) di sekeliling pencadang.
6. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal masing-masing ekstrak umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan MRSA setelah diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37 °C berdasarkan konsentrasi terendah dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif ditandai dengan berkurangnya pertumbuhan bakteri pada media agar.

7. Prinsip potensi secara umum yaitu membandingkan respon dari satu mikroba uji yang peka dalam kondisi percobaan yang sama terhadap sampel yang diuji dengan antibiotik pembanding.

4.6 kerangka Operasional





4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Simplisia Umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*)

Sampel Umbi bawang putih tunggal yang didapatkan melalui *e-commerce* Sidoarjo, Jawa Timur. Umbi bawang putih tunggal sebanyak 3 kg di kupas kulitnya, lalu dicuci menggunakan air mengalir. Sampel diiris tipis tipis kemudian dikeringkan dalam ruangan menggunakan ac dengan suhu 16°C selama 6 hari dan setelah kering dilanjutkan sortasi kering. Selanjutnya dihaluskan menggunakan blender dan dilakukan pengayakan hingga diperoleh serbuk kering, lalu disimpan dalam wadah bersih dan tertutup.

4.7.2 Standarisasi Simplisia

a. Parameter Spesifik

1. Identifikasi Simplisia

Parameter identifikasi dilakukan dengan tujuan memberikan identitas objektif dari nama tumbuhan. Deskripsi tata nama mencakup nama ekstrak atau simplisia, nama latin tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan serta nama Indonesia tumbuhan (Vernanda *et al.*, 2019).

2. Penetapan Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan pengamatan terhadap bentuk, warna, bau, dan rasa (Vernanda *et al.*, 2019)

b. Parameter Non Spesifik

1. Penetapan Susut Pengerinan

Susut pengerinan adalah penurunan berat bahan setelah pengeringan. Untuk pengukuran, gunakan simplisia serbuk halus nomor 8. Timbang 1–2 gram pada lempeng yang telah ditara, ratakan, lalu tunggu hingga alat menunjukkan selesai (FHI, 2017).

2. Kadar Abu Total

Simplisia seberat 2 gram dimasukkan ke dalam krus porselen yang sudah ditara dan dipijarkan, lalu diratakan. Krus porselen dipijarkan Kembali dengan suhu 800°C selama 6 jam, didinginkan,

dan ditimbang. Dari selisih berat, kadar abu simplisia dapat dihitung (FHI,2017).

3. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Residu yang diperoleh dari kadar abu total ditambahkan menggunakan 25 ml HCL 2N aduk, kemudian diamkan selama 5 menit. Disaring menggunakan kertas saring, bagian yang tertinggal pada kertas saring dipijarkan dan dihitung kadar abu yang tidak larut asam.

4. Kadar Sari Larut Air (KLSA)

Penentuan kadar sari larut air dilakukan dengan menimbang 5 gram simplisia, dimasukkan ke dalam erlenmeyer, dan ditambahkan 100 ml air jenuh 3 tetes kloroform. Campuran dikocok terus-menerus selama 6 jam, kemudian didiamkan 18 jam. Setelah disaring, 20 ml filtrat dipindahkan ke cawan porselen yang sudah dipanaskan dan ditimbang. Cawan dipanaskan di water bath hingga bobot tetap, lalu dikeringkan dalam oven pada 105°C hingga berat konstan. Kadar sari larut air dihitung dan dinyatakan dalam persentase.

$$\text{Kadar Sari Larut Air} = \frac{\text{kadar sari larut dalam air}}{\text{Berat simplisia}} \times 5 \times 100\%$$

5. Kadar Sari Larut Etanol (KLSE)

Penentuan kadar sari larut air dilakukan dengan menimbang 5 gram simplisia, dimasukkan ke dalam erlenmeyer, dan ditambahkan 100 ml etanol 96%. Campuran dikocok terus-menerus selama 6 jam, kemudian didiamkan 18 jam. Setelah disaring, 20 ml filtrat dipindahkan ke cawan porselen yang sudah dipanaskan dan ditimbang. Cawan dipanaskan di water bath hingga bobot tetap, lalu dikeringkan dalam oven pada 105°C hingga berat konstan. Kadar sari larut air dihitung dan dinyatakan dalam persentase.

$$\text{Kadar Sari Larut Etanol} = \frac{\text{kadar sari larut dalam Etanol}}{\text{Berat simplisia}} \times 5 \times 100\%$$

4.7.3 Pembuatan Ekstrak Umbi bawang putih tunggal

Serbuk kering umbi bawang putih tunggal diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan etanol 96%. Proses maserasi dilakukan dengan merendam simplisia bawang putih tunggal menggunakan pelarut sebanyak 10 kali dari berat sampel hingga seluruhnya terendam. Perendaman dilakukan sambil sesekali diaduk selama 3x24 jam. Setelah itu, campuran disaring untuk memisahkan filtrat. Residu yang tersisa kemudian direndam kembali dan disaring hingga diperoleh filtrat tambahan. Semua filtrat yang didapat kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator vakum* pada suhu 40°C, lalu dilanjutkan dengan penguapan di oven pada suhu 50°C hingga terbentuk ekstrak kental. Selanjutnya, dilakukan perhitungan persen rendemen, yaitu persentase antara berat ekstrak kental yang diperoleh dengan berat serbuk simplisia yang digunakan. Hasil rendemen harus memenuhi batas minimum sesuai ketentuan yang tertera pada monografi ekstrak masing-masing bahan (FHI II, 2022).

$$\text{Rendemen (\%)} = \left(\frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Bahan baku awal}} \right) \times 100\%$$

4.7.4 Standarisasi Ekstrak

a) Parameter Spesifik

1. Identitas Ekstrak

Pendeskripsian tata nama mencakup penulisan nama simplisia dan ekstraknya, nama latin tanaman, bagian tanaman yang digunakan, serta nama lokal atau nama Indonesia dari tanaman tersebut (Depkes RI, 2017).

2. Penetapan Organoleptik Ekstrak

Pemeriksaan organoleptik ekstrak meliputi bentuk, bau, rasa dan warna (Depkes RI, 2000).

b) Standarisasi Parameter Non Spesifik

1. Penetapan Susut Penguapan

Penetapan susut penguapan serbuk dilakukan menggunakan alat moisture balance. Proses pengeringan dilakukan pada suhu 105°C dengan cara menimbang 2 gram ekstrak yang diletakkan di atas lempeng yang telah ditimbang sebelumnya. Ekstrak kemudian diratakan, dan

pengeringan dilakukan hingga alat memberikan tanda bunyi sebagai indikasi proses selesai (Krismayadi *et al.*, 2024)

2. Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 2–3 gram sampel yang telah dihaluskan ditimbang dengan tepat, kemudian dimasukkan ke dalam krus silikat yang sebelumnya telah dipijarkan dan ditimbang hingga mencapai bobot tetap. Sampel dipijarkan perlahan sampai seluruh arangnya habis, lalu didinginkan dan ditimbang kembali. Jika arang belum hilang sepenuhnya, tambahkan air panas, aduk, lalu saring menggunakan kertas saring bebas abu. Kertas saring yang berisi sisa penyaringan kemudian dipijarkan bersama dalam krus yang sama. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam krus, diuapkan, dan dipijarkan kembali hingga bobotnya tetap pada suhu $800 \pm 25^\circ\text{C}$. Kadar abu total kemudian dihitung berdasarkan berat sampel awal dan dinyatakan dalam persen (% b/b) (Depkes RI, 2017).

$$\text{kadar abu total (\% b/b)} = \frac{W - W_1}{W_2} \times 100\%$$

Keterangan :

W = Bobot akhir krus berisi abu

W₁ = bobot kosong krus

W₂ = bobot sampel sebelum dipijarkan

3. Penetapan Kadar Abu Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total direbus dengan 25 ml asam klorida selama 5 menit. Setelah itu, bagian yang tidak larut disaring menggunakan kertas saring bebas abu, lalu dicuci dengan air panas. Sisa yang tertinggal pada kertas saring kemudian dipijarkan di dalam krus hingga mencapai bobot tetap pada suhu $800 \pm 25^\circ\text{C}$ (Krismayadi *et al.*, 2024)

$$\text{kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu sisa pijar}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\%$$

4.7.5 Skrining Fitokimia

1. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak umbi bawang tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) dilarutkan dalam 3 mL etanol 96%. Selanjutnya, ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,1 g dan 2 tetes HCl pekat. Terbentuknya warna oranye kekuningan hingga merah tua menunjukkan hasil positif adanya senyawa flavonoid.

2. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 g ekstrak umbi bawang tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL akuades, kemudian dipanaskan di atas penangas air selama ± 2 menit. Setelah didinginkan, larutan disaring dan filtrat yang diperoleh digunakan untuk pengujian alkaloid. Sebanyak 0,5 mL filtrat dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi alkaloid. Penambahan dua tetes pereaksi Wagner menghasilkan endapan coklat hingga hitam, pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih atau kuning, sedangkan pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan merah tua. Terbentuknya endapan tersebut menunjukkan hasil positif adanya senyawa alkaloid.

3. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL akuades. Larutan dikocok kuat selama ± 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa stabil dengan tinggi 1–10 cm yang tidak hilang setelah penambahan satu tetes HCl 2 N menunjukkan hasil positif adanya senyawa saponin.

4. Uji Tannin

Sebanyak 0,5 g ekstrak umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) ditambahkan 10 mL akuades panas, kemudian ditambahkan 3 tetes larutan NaCl 10%, diaduk hingga homogen, dan disaring. Filtrat yang diperoleh selanjutnya

ditambahkan larutan gelatin serta 5 mL NaCl 10%. Terbentuknya endapan menunjukkan hasil positif adanya senyawa tanin.

5. Uji Terpenoid dan Steroid

Sebanyak 0,5 g ekstrak umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) dilarutkan dalam 3 mL kloroform atau 3 mL etanol 96%. Selanjutnya, ditambahkan 2 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL asam sulfat pekat (H₂SO₄) secara hati-hati melalui dinding tabung reaksi. Terbentuknya perubahan warna dari ungu menjadi biru atau hijau menunjukkan adanya senyawa steroid, sedangkan munculnya warna kecokelatan pada batas permukaan larutan mengindikasikan adanya senyawa terpenoid.

4.7.5 Pembuatan Fraksinasi Ekstrak Umbi bawang putih Tunggal

Sebanyak 10 gram ekstrak etanol 70% dan etanol 96% umbi bawang putih tunggal (*Allium sativum* var. *solo garlic*) disuspensikan dalam 75 ml akuades hangat, kemudian dilakukan proses fraksinasi menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksana sebanyak 75 ml dan diulangi tiga kali. Hasil fraksi n-heksana yang diperoleh selanjutnya diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C hingga kental, lalu ditimbang dan disebut sebagai fraksi n-heksana. Residu dari proses fraksinasi tersebut kemudian dipartisi kembali menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 75 ml, juga dilakukan sebanyak tiga kali. Fraksi etil asetat yang dihasilkan selanjutnya diuapkan dengan metode yang sama menggunakan evaporator pada suhu 40°C, kemudian ditimbang dan dinamakan fraksi etil asetat.

4.7.6 Sterilisasi Alat

Semua peralatan yang digunakan disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan menggunakan oven pada suhu 121°C selama kurang lebih 2 jam (Wahyuni *et al.*, 2024).

4.7.7 Pembuatan *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Sebanyak 33 g media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 1 liter air suling sambil dipanaskan hingga larut sempurna. Setelah itu, media dituangkan ke dalam beberapa tabung reaksi dengan volume sekitar ±10 ml untuk base layer, ±8 ml untuk seed layer, serta sebagian dibuat sebagai agar

miring untuk peremajaan bakteri. Selanjutnya, media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Puradewa, 2021).

4.7.8 Penyiapan Inokulum MRSA

MRSA diambil dari isolate stock dan dibiakkan dalam media MHA selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil biakan dibuat suspensi dengan larutan NaCl 0,9% steril. Transmittan suspensi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 580 nm menggunakan blanko larutan NaCl 0,9% (dilakukan pengenceran bila diperlukan) hingga diperoleh transmittan sebesar 25%.

4.7.9 Preparasi Larutan Standart dan Larutan Uji

1. Larutan Standart

Sebanyak 50 mg vancomycin ditimbang lalu dilarutkan dalam air steril bebas CO₂ hingga volumenya mencapai 10 ml, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi yang diinginkan.

2. Larutan Uji

Larutan induk disiapkan dengan menimbang 8 gram ekstrak, kemudian dilarutkan menggunakan etanol 96% hingga volume mencapai 10 ml. Dari larutan induk tersebut dilakukan pengenceran untuk memperoleh variasi konsentrasi sebagai berikut :

- 1) Konsentrasi 80% : dibuat langsung dari larutan induk, yaitu 8 g ekstrak yang telah dilarutkan dalam etanol 96% hingga volume 10 ml.
- 2) Konsentrasi 60% : diambil 7,5 ml larutan induk lalu ditambahkan etanol 96% hingga total volume 10 ml.
- 3) Konsentrasi 50%: diambil 6,25 ml larutan induk kemudian ditambah etanol 96% sampai volumenya menjadi 10 ml.
- 4) Konsentrasi 40%: dipipet 5 ml larutan induk dan diencerkan dengan etanol 96% hingga mencapai volume 10 ml.
- 5) Konsentrasi 20%: dipipet 2,5 ml larutan induk lalu ditambahkan etanol 96% sampai volume 10 ml.
- 6) Konsentrasi 10%: dipipet 1,25 ml larutan induk kemudian diencerkan dengan etanol 96% hingga mencapai volume 10 ml

4.7.10 Skrining KHM Ekstrak Umbi bawang putih tunggal.

Penetapan KHM ekstrak umbi bawang putih tunggal dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan media nutrient agar. Sebanyak ± 15 ml media NA yang bersuhu $45-50^{\circ}\text{C}$ dituangkan secara aseptik ke dalam cawan petri berdiameter 20 cm dan dibiarkan hingga memadat sebagai base layer. Selanjutnya, sebanyak 5 μl inokulum MRSA dicampurkan ke dalam ± 10 ml media NA bersuhu $45-50^{\circ}\text{C}$, kemudian divorteks dan dituangkan di atas base layer untuk membentuk seed layer, lalu dibiarkan hingga memadat. Setelah itu, dibuat 19 lubang pada media menggunakan alat pencetak lubang steril (2 lubang untuk kontrol dan 17 lubang untuk sampel). Vancomycin digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan etanol digunakan sebagai kontrol negatif. Sampel dan kontrol dimasukkan ke masing-masing lubang, kemudian media diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 24 jam. Setelah inkubasi, diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong. Konsentrasi terkecil ekstrak yang masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri ditetapkan sebagai nilai KHM.

4.7.11 Penetapan Rasio Potensi Ekstrak Umbi bawang putih tunggal

Penetapan rasio potensi ekstrak kayu manis dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan media nutrient agar. Sebanyak ± 15 ml media NA bersuhu $45-50^{\circ}\text{C}$ dituangkan secara aseptik ke dalam cawan petri berdiameter 20 cm, kemudian dibiarkan hingga memadat sebagai base layer. Setelah itu, sebanyak 5 μl inokulum MRSA dicampurkan ke dalam ± 10 ml media NA bersuhu $45-50^{\circ}\text{C}$, divorteks, lalu dituangkan di atas base layer dan dibiarkan hingga memadat membentuk *seed layer*. Selanjutnya, dibuat 6 lubang pada media menggunakan alat pencetak lubang steril, terdiri dari 3 lubang untuk larutan uji dan 3 lubang untuk larutan standar. Kedua jenis larutan tersebut dimasukkan ke dalam lubang yang sesuai, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 24 jam. Pengujian dilakukan dengan tiga tingkat dosis pengenceran, yaitu High, Medium, dan Low. Setelah inkubasi, zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur menggunakan jangka sorong.