

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) yang diambil dari Desa Tinap, Kecamatan Sukomoro, Kabupaten Magetan, Jawa Timur.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng). Daun diambil secara acak, berbentuk bulat telur tipis dan berwarna hijau dalam kondisi yang masih segar, tidak busuk belum berubah warna dan bersih dari kotoran yang diperoleh dari Desa Tinap, Kecamatan Sukomoro, Kabupaten Magetan, Jawa Timur, pada bulan Februari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah ekstrak daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan larutan penyari etanol 70% dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan *n*-heksana, etil asetat, dan air.

Variabel utama kedua adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun kari fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun kari terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dapat diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam

Penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) dalam berbagai konsentrasi.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, kondisi laboratorium yang meliputi kondisi inkubasi, alat dan bahan yang digunakan harus steril, media yang digunakan dalam penelitian, dan metode ekstraksi.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah berupa luas diameter daerah hambat yang dipengaruhi oleh ekstraksi dan fraksinasi daun kari yang dilihat dengan metode difusi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) adalah bagian dari tanaman kari yang diperoleh dari hasil pemetikan

Kedua, serbuk daun kari adalah hasil dari penyerbukan simplisia daun kari menggunakan mesin penggiling, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun kari adalah hasil ekstraksi dari serbuk daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) dibuat dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Hasil ekstrak dipekatkan dengan cara diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator*.

Keempat, fraksi *n*-heksana daun kari adalah hasil fraksinasi dari ekstrak etanol dengan pelarut *n*-heksana kemudian dipekatkan di atas *waterbath*.

Kelima, fraksi etil asetat daun kari adalah hasil fraksinasi dari residu fraksi *n*-heksana dengan pelarut etil asetat kemudian dipekatkan di atas *waterbath*.

Keenam, fraksi air dari daun kari adalah hasil fraksinasi dari residu fraksi etil asetat dengan pelarut air kemudian dipekatkan di atas *waterbath*.

Ketujuh, bakteri uji adalah bakteri yang digunakan dalam penelitian yaitu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Kedelapan, metode difusi adalah dengan memabandingkan senyawa yang efektif dan mengukur luas daerah hambatan atau daya hambat pertumbuhan bakteri menggunakan kontrol negatif DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) 5% dan kontrol positif antibiotik gentamisin.

Kesembilan, metode dilusi adalah dengan menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yaitu berupa seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,63%; 0,32%; 0,16%; 0,08%; 0,04%. kontrol negatif adalah fraksi teraktif dan kontrol positif adalah suspensi bakteri.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kari berwarna hijau, bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA), *Klinger Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Sulfide Indol Motilitas* (SIM), Citrat. Bahan kimia yang digunakan adalah pelarut *n*-heksana, eti asetat, etanol 70%, aquadest steril, larutan standart *Mc Farland* 0,5, pelarut DMSO 5% dan gentamisin.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat penyerbuk, inkas, timbangan analitik, jarum Ose, *Moisture Balance*, tabung reaksi, gelas ukur, cawan porselen, erlenmeyer, cawan petri, corong pisah, corong kaca, pipet ukur, autoklaf, evaporator, oven, *waterbath*, pinset, kertas saring, kapas, mikroskop, kaca obyek, deglas, lampu spiritus, inkubator, kaki tiga, selang, kain flannel, beker glass, batang pengaduk, rak tabung reaksi, labu takar, plat KLT, detektor sinar 254 nm, 366 nm.

D. Rencana Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) dilakukan dengan menunjukkan tanaman kari yang meliputi daun, batang, bunga dan buah kemudian menetapkan kebenarannya sesuai ciri – ciri morfologinya. Determinasi dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Kabupaten Karanganyar. Determinasi ini bertujuan untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang baik secara makroskopis maupun mikroskopis tanaman kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) terhadap pustaka yang dibuktikan di laboratorium.

2. Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

Daun kari 3,3 kg dicuci bersih dengan air yang mengalir sampai terbebas dari kotoran dan debu, dikering anginkan. Setelah kering kemudian dioven pada suhu 50°C, lalu dihaluskan dengan blender dan diayak dengan ayakan no 40 mesh sampai serbuk terayak habis.

3. Penetapan kadar lembab serbuk daun kari

Serbuk daun kari dilakukan penetapan kadarm lembab dengan cara menimbang serbuk daun kari sebanyak 2 gram, kemudian diukur kadar lembab serbuk dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Serbuk daun kari hasil pengeringan kemudian ditimbang dan dihitung susut pengeringan dengan alat *Moisture Balance* pada selama 30 menit atau sampai berat konstan dengan persyaratan 5-10%

4. Pembuatan ekstrak secara maserasi

Maserasi dilakukan dengan cara 10 bagian serbuk daun kari ditambahkan dengan 75 bagian cairan penyari etanol 70%. Campuran tersebut didiamkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk. Filtrat dengan ampas dipisahkan menggunakan kain flanel. Ampas ditambahkan cairan penyari diaduk dan disaring, sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40°C sehingga menjadi ekstrak etanolik daun kari. Penetapan persen rendemen diperoleh dari

menimbang hasil ekstrak pekat, kemudian hasil ekstrak pekat dibagi dengan berat serbuk daun kari kemudian dikalikan 100%.

Hitung rendemen dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot sampel}} \times 100\%$$

5. Uji bebas etanol ekstrak daun kari

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol. Uji bebas etanol bertujuan untuk mengetahui ekstrak tidak terdapat etanol (Kurniawati 2015).

6. Uji Bobot jenis ekstrak

Piknometer yang sudah kering dan bersih ditimbang. Kemudian dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C kemudian ditimbang. Ekstrak ditimbang 5 gram di larutin dengan etanol 70% 100 ml menjadi ekstrak cair 5% diatur suhu hingga $\pm 20^\circ\text{C}$, lalu dimasukkan dalam piknometer. Dibuang kelebihan ekstrak, atur suhu piknometer yang telah isi hingga suhu 25°C kemudian ditimbang (Depkes RI 2000). Replikasi sebanyak 3 kali untuk masing-masing ekstrak.

Hitung bobot jenis dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{BJ} = \frac{\text{Bobot piknometer(ekstrak)} - \text{Bobot piknometer kosong}}{\text{Bobot piknometer (air)} - \text{Bobot piknometer kosong}}$$

7. Uji Kadar air ekstrak

Penentuan kadar air menggunakan cara metode destilasi dengan alat *Sterling Bidwell* dengan pelaut toluen. Prinsipnya adalah mengeluarkan air menggunakan pelarut yang memiliki titik didih lebih tinggi daripada air, tidak campur dengan air, dan memiliki bobot jenis yang lebih rendah daripada air (Rohman & Sumantri 2014) Toluene dijenuhkan dengan air terlebih dahulu, 200 mL toluen ditambahkan 10 mL air dimasukkan di dalam corong pisah, setelah di fraksinasi di diamkan beberapa menit. Kedua lapisan air dan toluene akan memisah, lapisan air dibuang. Kemudian ekstrak sebanyak 20 gram ditimbang seksama dan dimasukkan ke dalam labu. Lalu dimasukkan lebih kurang 200 mL

toluen P ke dalam labu dan alat dihubungkan. Setelah lapisan air dan toluene memisah sempurna, volume air dibaca dan dihitung kadar air dalam persen (Depkes RI 2000). Replikasi sebanyak 3.

Hitung kadar air dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar air(\%)} = \frac{\text{Volume air (mL)}}{\text{Bobot sampel (gram)}} \times 100\%$$

8. Uji identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun kari

Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun kari digunakan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak daun kari. Identifikasi senyawa kimia dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setiabudi, Surakarta.

8.1 Uji saponin. Ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambahkan aquadest, kemudian dipanaskan selama 2 sampai 3 menit. Setelah dipanaskan tunggu sampai dingin lalu kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil menandakan adanya kandungan saponin, dengan baku pembandingnya gliserisin (Ramyashree *et al.* 2012).

8.2 Uji tanin. Ekstrak daun kari sebanyak 0,5 gram ditambahkan aquadest sampai terendam dan dipanaskan selama 3 sampai 5 menit. Kemudian ditambahkan 2 tetes larutan NaCl 10% lalu direaksikan dengan menambahkan FeCl₃. Perubahan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin, dengan baku pembanding asam galat (Ramyashree *et al.* 2012).

8.3 Uji flavonoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun kari ditambahkan dengan 5 mL etanol, dipanaskan selama lima menit di dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah beberapa tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 g bubuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna kuning, jingga, merah tua dalam waktu 3 menit pada lapisan amil alkohol, dengan baku pembanding kuersetin dan rutin (Ngajow *et al.* 2013).

8.4 Uji steroid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun kari ditempatkan pada plat tetes dan ditambahkan asam asetat anhidrat sampai sampel terendam semuanya, dibiarkan selama 15 menit, enam tetes larutan dipindahkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes asam sulfat pekat. Adanya steroid

ditunjukkan dengan adanya cincin warna hijau biru atau merah tua, dengan baku pembandingan stigmasterol (Ngajow *et al.* 2013).

8.5 Uji alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara 0,5 gram ekstrak daun kari ditambahkan 5 tetes HCl 2 N dipanaskan kemudian ditambah beberapa tetes pereaksi Mayer reaksi positif bila terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning. Penambahan pereaksi Dragendrof terbentuk endapan merah sampai jingga menunjukkan adanya alkaloid, dengan baku pembandingan Efedrin (Alamsyah *et al* 2014).

9. Fraksinasi ekstrak daun kari

Fraksinasi dengan *n*-heksana, fraksinasi dari ekstrak etanolik daun kari dibuat dengan menimbang ekstrak hasil maserasi di dalam beaker glass sebanyak 10 gram. Ekstrak etanolik yang sudah ditimbang disuspensikan dengan air sebanyak 75 mL kemudian dipisahkan menggunakan corong pisah dengan menambahkan *n*-heksana 75 mL sebanyak tiga kali, sehingga didapatkan fraksi *n*-heksana. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan cara ditampung dalam evaporator pada suhu 40°C lalu ditimbang dan disebut sebagai fraksi *n*-heksana.

Fraksinasi etil asetat dan air, residu dari fraksinasi *n*-heksana dipisahkan di corong pisah dengan menambahkan etil asetat 75 mL sebanyak tiga kali, sehingga didapatkan fraksi etil asetat. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan cara ditampung dalam evaporator pada suhu 40°C lalu ditimbang dan disebut sebagai fraksi etil asetat.

Fraksi air daun kari dibuat dengan cara fraksinasi dari residu etil asetat, kemudian diperoleh fraksi air yang berada di bagian bawah. Fraksi air kemudian dipekatkan pada *waterbath*.

10. Sterilisasi

Sterilisasi inkas dengan formalin, media agar yang digunakan disterilisasikan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C dan uap bertekanan tinggi 15 psi selama 15 menit. Alat-alat dan gelas yang ada ukurannya disterilisasikan dengan oven pada suhu 170°C-180°C selama 2 jam, sedangkan

alat-alat seperti jarum Ose disterilisasi dengan pemanasan api langsung. (Brooks *et al.* 2014)

11. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dari biakan murni, diambil beberapa ose steril dan ditanam dalam tabung yang berisi 5 mL medium *Brain Heart Infussion* (BHI) yang kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standart *McFarland* 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel bakteri dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Bonang & koeswandono 1982).

12. Identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa*

12.1 Identifikasi bakteri berdasarkan koloni. Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasikan pada medium *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Penampakan membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen yang berwarna kehijauan (Brooks *et al.* 2014).

12.2 Identifikasi bakteri berdasarkan morfologi. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang. Pewarnaan Gram berguna untuk dapat meyakinkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* merupakan Gram negatif. Pewarnaan Gram dimulai dengan pemberian zat warna dasar, kristal violet. Larutan iodium diberikan selanjutnya, seluruh bakteri akan terwarnai biru pada tahap ini dalam proses pewarnaan. Kemudian sel diberikan alkohol. Sel Gram positif akan tetap mempertahankan kompleks kristal violet-iodin sehingga tetap berwarna biru, sel Gram negatif kehilangan warna oleh alkohol. Sebagai langkah akhir, zat warna lawan, safranin (pewarna merah) diberikan sehingga sel-sel Gram negatif yang tidak berwarna akan berwarna merah sedangkan sel Gram positif akan tetap berwarna ungu (Brooks *et al.* 2014).

12.3 Identifikasi bakteri berdasarkan fisiologi. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat diketahui sifat fisiologinya dengan inokulasi pada media uji biokimia. Macam media yang digunakan inokulasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* adalah Kliger Iron Agar (KIA), Lysine Iron Agar (LIA), Sulfide Indole Motilitas (SIM), Citrat dan *Pseudomonas Selektif agar* (PSA). Masing-

masing media tersebut diinokulasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Hasilnya dapat diketahui dengan perubahan warna masing-masing media atau dengan penambahan reagen.

12.3.1 Media Kligler's Iron Agar (KIA). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Memberikan hasil K/KS⁻, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak memfermentasi glukosa dan laktosa, S⁻ artinya uji H₂S negatif ditunjukkan tidak adanya pembentukan warna hitam pada media KIA. Media KIA berwarna merah (Bonang & Koeswardono 1982).

12.3.2 Media Sulfide Indole Motility (SIM). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Pengujian SIM memberikan hasil – – +, artinya uji H₂S negatif ditandai dengan tidak adanya pembentukan warna hitam pada media SIM, pada penambahan reagen Erlich A dan B permukaan media tidak berwarna merah ini berarti uji indol negatif, uji motilitasnya positif, ditunjukkan dengan adanya penyebaran pertumbuhan bakteri di media SIM. Media SIM berwarna kuning (Bonang & Koeswardono 1982).

12.3.3 Media Lysine Iron Agar (LIA). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan gores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Pengujian dengan media LIA memberikan hasil K/KS⁻, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin, S⁻ artinya uji H₂S negatif ditunjukkan tidak adanya warna hitam pada media LIA. *Lysine Iron Agar* (LIA) dapat digunakan untuk identifikasi mikroba penghasil enzim yang mampu mendekarboksilasi asam amino lisin dan memproduksi gas H₂S, Media LIA berwarna ungu (Bonang & Koeswardono 1982).

12.3.4 Media Citrat. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan gores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan

citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru, media citrate berwarna hijau (Bonang & Koeswardono 1982).

13. Pengujian aktivitas secara difusi

Hasil ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun kari yang didapatkan diuji secara mikrobiologi dengan bakteri uji *pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Metode yang digunakan adalah metode difusi. Metode difusi yang digunakan menentukan luas zona hambat terhadap bakteri uji.

Metode difusi menggunakan cawan petri steril yang telah diisi dengan media MHA. Larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dibuat konsentrasi 5%, 10% dan 20% dengan menggunakan pelarut DMSO 5%. Secara aseptis pada cawan petri yang diisi media MHA digoresi suspensi bakteri dan diamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi bakteri berdifusi ke dalam media, kemudian setiap cawan terdapat 6 cakram dengan jarak yang sama. Pada cakram 1 sampai 5 direndam larutan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan DMSO 5% diambil 0,5 μ L pada setiap konsentrasi menggunakan pipet volume, kemudian didiamkan beberapa menit, sedangkan cakram 6 adalah kontrol positif yang berisi antibiotik gentamisin 10 μ g. Replikasi dilakukan tiga kali. Kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya. Diameter zona hambat sekitar sumuran diukur, dinyatakan dalam satuan mm. Ketentuan antibakteri adalah sebagai berikut: daerah hambatan 20 mm atau lebih mengindikasikan sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm mengindikasikan kuat, 5-10 mm mengindikasikan sedang dan daerah hambatan 5 mm atau kurang mengindikasikan lemah (Davis & Stout 1971).

14. Pengujian aktivitas secara dilusi

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif. Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung yang terdiri dari 12 tabung dengan konsentrasi kontrol positif (-), 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,63%; 0,32%; 0,16%; 0,08%; 0,04% dan kontrol negatif (+). Media BHI dimasukan 0,5 mL pada setiap tabung kecuali tabung 1, 2 dan 12. Secara aseptis, dimasukan 1 mL larutan stok (fraksi teraktif) yang akan di uji pada tabung 1, kemudian pada tabung 2

dimasukan 0,5 mL larutan stok yang di uji (fraksi teraktif) dan ditambahkan 0,5 mL suspensi bakteri divortex, kemudian pada tabung 3 dimasukan 0,5 mL larutan stok divortex dan dipipet 0,5 mL dimasukan kedalam tabung 4 divortex, perlakuan ini dilakukan sampai tabung 11, tetapi pada tabung 11 dibuang 0,5 mL. Tambahkan 0,5 mL suspensi bakteri dari tabung 2 sampai tabung 11, pada tabung 12 ditambahkan suspensi bakteri 1 mL. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati zona kekeruhan (KHM) dan zona jernih (KBM). Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Diamati ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media selektif *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

15. Identifikasi golongan senyawa dari fraksi teraktif daun kari menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT)

Fraksi yang paling aktif diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan melarutkan fraksi teraktif daun kari dengan pelarut yang sesuai, kemudian menotolkannya menggunakan pipa kapiler di atas lempeng fase diam berupa silika gel GF₂₅₄. Setelah totolan kering lempeng KLT dimasukkan dalam bejana yang sudah jenuh oleh fase gerak yang sesuai. Pengembangan dilakukan sampai jarak tertentu, kemudian dilakukan deteksi di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Bercak yang terdeteksi ditentukan harga R_f dan penampakan warna.

15.1 Identifikasi saponin. Adanya senyawa saponin dapat diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan kloroform: metanol: air (13:7:2). Setelah lempeng kromatografi di diamkan beberapa menit dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan. Pengamatan noda pada lampu UV 254 nm dan 366 nm. Pereaksi penampak yang digunakan peraksi Lieberman Burchard. Hitung nilai R_f dan noda bercak berwarna ungu atau noda gelap pada sinar UV 254 nm dengan baku pembanding gliserisin (Rachman *et al.* 2018).

15.2 Identifikasi tanin. Senyawa tanin dapat diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak *n*-heksana-etil asetat (6:4). dengan penampak noda Pereaksi FeCl₃ 5 %. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna hitam pada sinar UV 254 nm dan 366 nm, dengan baku pembanding asam galat (Kusumo *et al.* 2017).

15.3 Identifikasi flavonoid. Senyawa flavonoid dapat diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan butanol: asam glasiak: air (4:1:5) dengan penampak noda uap amoniak. Pada UV 254 nm memberi peredaman, UV 366 nm terbentuk fluoresensi dan terdapat noda hijau muda, merah muda, hijau. Terjadi perubahan warna hijau tua setelah diuapi amonia yang cepat, dengan baku pembanding kuersetin & rutin (Koirewoa *et al.* 2012).

15.4 Identifikasi steroid. Senyawa steroid dapat diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah kloroform-metanol (9:1), dengan penampak noda pereaksi Liberman-Buchard disertai dengan pemanasan pada suhu 105°C selama 5 menit. Reaksi positif steroid ditunjukkan dengan adanya noda berwarna hijau, biru, dan baku pembanding stigmasterol (Yuda *et al.* 2017).

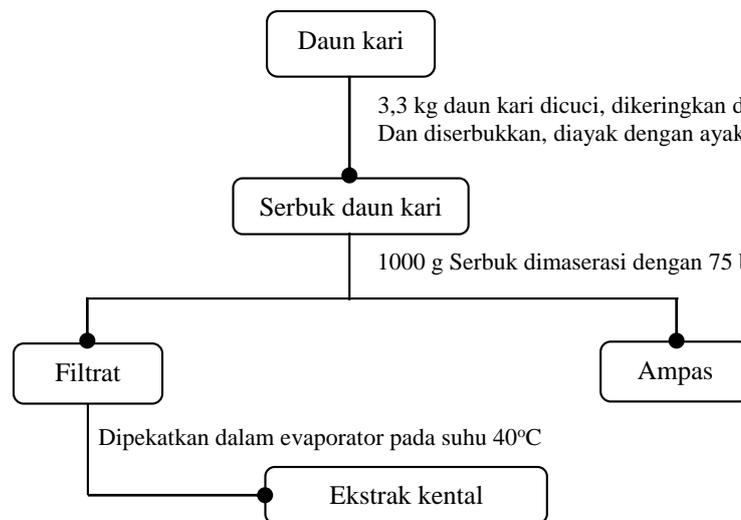
15.5 Identifikasi alkaloid. Senyawa alkaloid dapat diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak menggunakan etil asetat: metanol: air (6:4:2) dimasukkan dalam *chamber*, dibiarkan sampai jenuh, pada silika GF₂₅₄ ditotolkan kira-kira 5 µl masing-masing sari etil asetat, air, dimasukkan dalam *chamber*, dielusi sampai tanda, diambil dan dibiarkan sampai kering. Ekstrak mengandung alkaloid bebas bila dilihat di bawah sinar UV 366 nm berfluoresensi atau berwarna jingga dengan pereaksi *dragendrof*, dan baku pembanding efedrin (Pratiwi *et al.* 2014).

E. Analisa Hasil

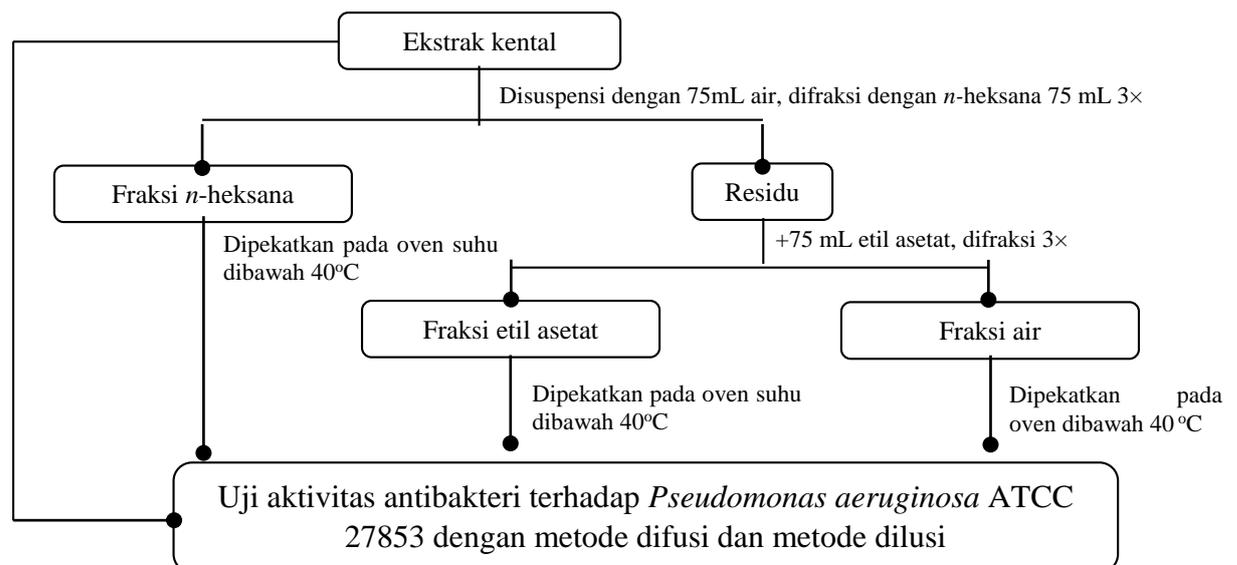
Hasil penelitian dianalisis berdasarkan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ditabung selektif reaksi dan media selektif. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan

berdasarkan hasil pengamatan, dimana konsentrasi terkecil adalah konsentrasi paling efektif. Kemudian data yang diperoleh dianalisis lagi dengan *Kolmogrof-Smirnof*, jika terdistribusi normal dilanjutkan dengan analisis menggunakan metode statistic *One Way Anova*.

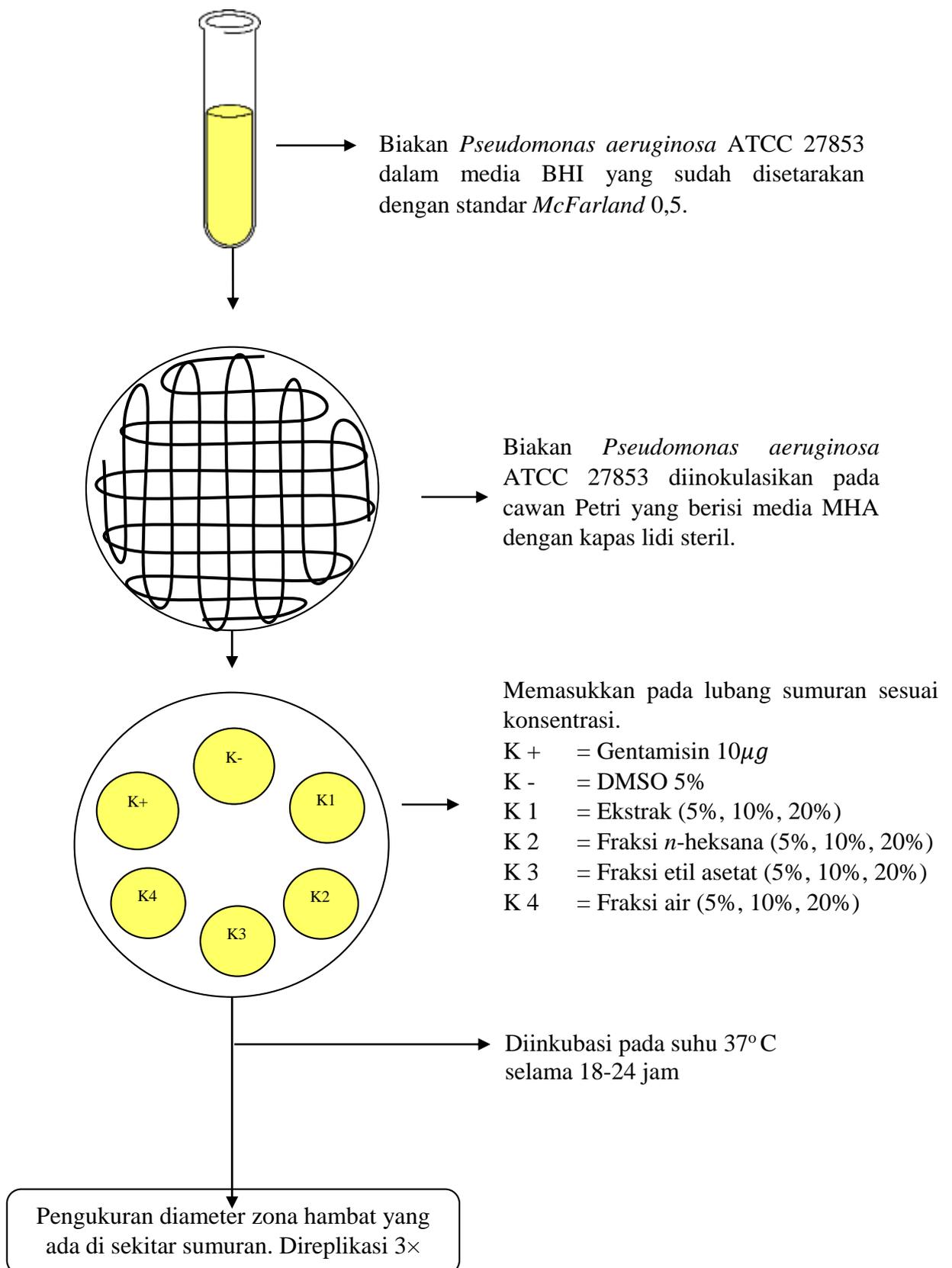
F. Skema Penelitian



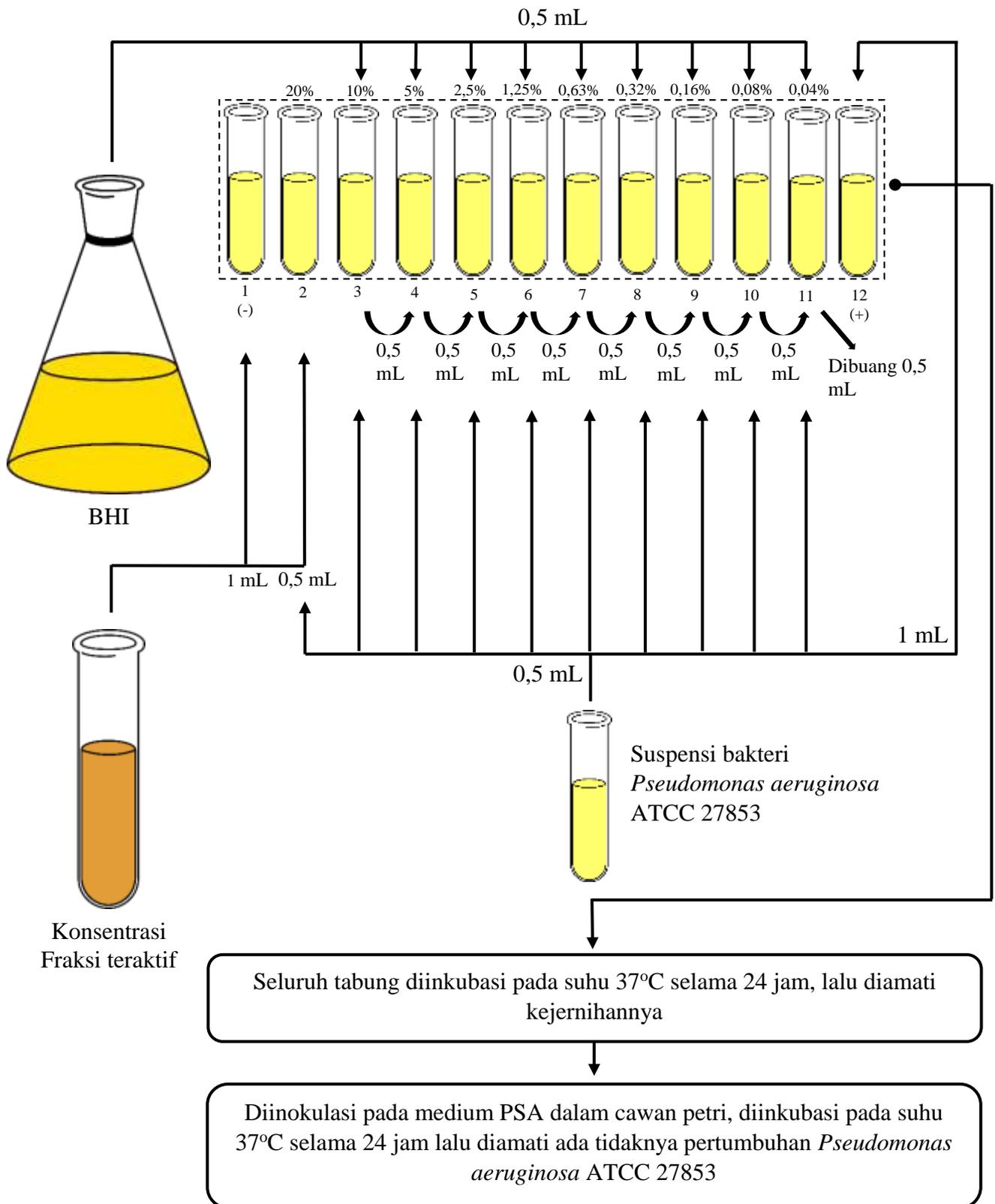
Gambar 3. Skema diagram kerja ekstrak etanol 70% daun kari dengan maserasi.



Gambar 4. Skema diagram kerja fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak daun kari dan pengujian aktivitas antibakteri.



Gambar 5. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri daun kari terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode difusi.



Gambar 6. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun kari terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode dilusi.

