

## BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

### A. Tanaman Kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng)

#### 1. Determinasi tanaman kari

Determinasi tanaman merupakan langkah awal yang dilakukan pada suatu penelitian menggunakan sampel berupa tanaman dan bagian dari tanaman tersebut. Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Kabupaten Karanganyar. Berdasarkan hasil determinasi dinyatakan bahwa benar tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng). Keterangan determinasi tanaman yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

#### 2. Pengumpulan, pengeringan, dan pembuatan serbuk daun kari

Tanaman kari yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Desa Tinap, Kecamatan Sukomoro, Kabupaten Magetan, Jawa Timur pada bulan Februari 2019. Daun ini diambil dalam kondisi yang masih segar, daun yang berwarna hijau dan bersih dari kotoran, mikroba serta hama. Daun kari yang telah diambil, kemudian dilakukan pembersihan untuk menghilangkan kotoran pada daun dengan dicuci dengan air yang mengalir. Kemudian ditiriskan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 2 hari. Tabel 1 menunjukkan persentase rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah.

**Tabel 1. Persentase rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah**

Berat basah (Kg)	Berat Kering (Kg)	Rendemen % (b/b)
3,3	1,8	54,54

Rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah yang diperoleh sebesar 54,54%. Hal ini karena daun kari memiliki kandungan air yang sedikit sehingga penyusutan pada saat pengeringan tidak terlalu besar. Pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air serta menghentikan reaksi enzimatik yang

menyebabkan perusakan simplisia serta mencegah tumbuhnya kapang, jamur dan mikroorganisme, sehingga simplisia tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama (Sulistiyani 2018). Perhitungan persentase rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah dapat dilihat pada lampiran 21.

Daun kari kering yang telah diserbukkan dihitung hasil rendemennya. Hasil rendemen dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Persentase rendemen berat serbuk terhadap berat daun kering**

Berat kering (Kg)	Berat serbuk (Kg)	Rendemen % (b/b)
1,8	1,1	61,11

Berdasarkan Tabel 2 hasil yang diperoleh persentase rendemen sebesar 61,11%. Pengurangan jumlah serbuk yang dihasilkan diduga karena pada saat proses penyerbukan ada beberapa serbuk yang menempel pada alat. Pembuatan serbuk bertujuan untuk memperluas permukaan kontak antara penyari dan permukaan simplisia sehingga senyawa aktif dalam tumbuhan dapat ditarik optimal pada proses ekstraksi (Sulistiyani 2018). Perhitungan persentase rendemen berat serbuk terhadap berat daun kering dapat dilihat pada lampiran 22.

### 3. Penetapan kadar lembab serbuk daun kari

Serbuk daun kari yang didapat dilakukan kadar lembabnya. Tabel 3 menunjukkan hasil rata-rata kadar lembab serbuk daun kari.

**Tabel 3. Rata-rata penetapan kadar lembab serbuk daun kari**

Replikasi	Bobot serbuk (gram)	Kadar lembab (%)
1	2,0	7,0
2	2,0	7,5
3	2,0	7,5
Rata-rata±SD		7,3±0,288

Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun kari menunjukkan persentase rata-rata daun kari sebesar 7,3%. Kadar air memenuhi syarat dimana serbuk tidak boleh melebihi batas 10% (Depkes RI 2000). Kadar lembab yang terlalu tinggi pada serbuk memudahkan pertumbuhan jamur dan bakteri serta perubahan kimiawi yang dapat merusak serbuk (Isnawati dan Arifin 2006). Hasil penetapan kadar lembab dapat dilihat pada lampiran 5.

#### 4. Pembuatan ekstrak daun kari

Metode pembuatan ekstrak dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi, karena metode tersebut lebih mudah dalam pengerjaannya, memerlukan alat yang sederhana, dan menghindari kerusakan senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan. Hasil persentase rendemen pembuatan ekstrak etanol 70% daun kari dapat dilihat tabel 4.

**Tabel 4. Persentase rendemen ekstrak daun kari**

Serbuk (gram)	Ekstrak kental (gram)	Rendemen % (b/b)
1000	180	18

Berdasarkan tabel 4 dapat dilihat bahwa persentase rendemen ekstrak etanol daun kari dari serbuk simplisia sebanyak 1000 gram dilarutkan dengan pelarut etanol 70% didapatkan ekstrak kental 180 gram sehingga diperoleh rendemen ekstrak sebesar 18%. Hasil perhitungan persen rendemen ekstrak etanol daun kari dapat dilihat di lampiran 24.

#### 5. Uji bebas etanol daun kari

Ekstrak kental daun kari dilakukan uji bebas etanol dengan cara esterifikasi alkohol. Hasil uji bebas etanol dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5. Uji bebas etanol daun kari**

Uji bebas etanol	Hasil
3 tetes ekstrak kental daun kari + 5 tetes asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) + 2 tetes asam sulfat pekat ( $\text{H}_2\text{SO}_4\text{conc}$ ), dipanaskan	Tidak tercium bau ester etil asetat (Kurniawati <i>et al.</i> 2015)

Tabel 5 menunjukkan bahwa ekstrak daun kari sudah bebas etanol yang ditandai tidak terbentuk bau ester etil asetat (bau seperti balon karet) dari reaksi esterifikasi yang dilakukan. Uji bebas etanol bertujuan untuk mengetahui bahwa ekstrak kental yang didapat bebas dari pelarut etanol, sehingga daya hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antibakteri, murni karena ada adanya aktivitas antibakteri pada senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol daun kari dan tidak dipengaruhi oleh pelarut etanol 70% sebagai pelarut pengekstraksi.

## 6. Uji bobot jenis ekstrak daun kari

Uji bobot jenis ekstrak dilakukan untuk memberikan batasan tentang besarnya massa persatuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang dan memberikan gambaran kandungan kimia terlarut (Depkes RI 2000). Hasil uji bobot jenis ekstrak daun kari dapat dilihat pada tabel 6 dan hasil perhitungan pada lampiran 25.

**Tabel 6. Uji bobot jenis daun kari**

Replikasi	Piknometer kosong (gram)	Piknometer + air (gram)	Piknometer + ekstrak (gram)	Bobot jenis (g/mL)
1	34,05	82,44	80,23	0,95
2	40,13	89,05	86,47	0,97
3	34,22	83,08	79,07	0,91
Rata-rata±SD				0,93 ± 0,03

Tabel 6 menunjukkan hasil uji bobot jenis ekstrak daun kari yang dilakukan menggunakan ekstrak daun kari diencerkan 5% dengan pelarut etanol 70% dan dilakukan 3 kali replikasi. Nilai penetapan bobot jenis tidak boleh melebihi berat jenis air yaitu 1 g/mL, dan nilai bobot jenis ekstrak <1 dinyatakan kontaminasinya kecil karena berupa ekstrak kental yang sedikit mengandung air (Depkes RI 2000). Data uji rata-rata bobot jenis yang diperoleh sebesar 0,93 g/mL.

## 7. Uji kadar air ekstrak daun kari

Uji kadar air ekstrak daun kari dilakukan untuk mengetahui batasan maksimal atau rentang tentang besarnya kandungan air dalam ekstrak Hasil uji kadar air dapat dilihat pada tabel 7 dan hasil perhitungan uji kadar air ekstrak daun kari.

**Tabel 7. Uji kadar air ekstrak daun kari**

Replikasi	Bobot ekstrak (gram)	Volume air (mL)	Kadar air (%)
1	20,016	0,5	2,49
2	20,008	0,5	2,49
3	20,011	0,5	2,49
Rata-rata±SD			2,49±0

Berdasarkan Tabel 7 hasil uji kadar ekstrak daun kari rata-rata  $2,49\% \pm 0$ , hasil kadar air ekstrak daun kari memenuhi syarat kadar air yang diperbolehkan adalah  $<10\%$  (Depkes RI 2000). Kadar air sangat mempengaruhi pada daya simpan ekstrak. Semakin banyak jumlah kadar air yang terkandung waktu simpan ekstrak semakin singkat, karena kadar air yang banyak pada ekstrak akan memudahkan tumbuhnya mikroba.

### 8. Uji identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun kari

Uji kandungan senyawa kimia merupakan pengujian pendahuluan untuk mengetahui kebenaran kandungan kimia yang ada di dalam ekstrak etanol daun kari. Identifikasi kandungan kimia dilakukan dengan uji kualitatif metode tabung. Hasil uji tabung dapat dilihat pada Tabel 8.

**Tabel 8. Uji kandungan kimia ekstrak daun kari dengan metode tabung**

Senyawa kimia	Pustaka	Hasil percobaan	Keterangan
Saponin	Terbentuk buih yang stabil (Ramyashree <i>et al.</i> 2012)	Buih tetap stabil	Positif
Tanin	Terbentuk warna hijau kehitaman (Ramyashree <i>et al.</i> 2012)	Warna hijau kehitaman	Positif
Flavonoid	Terbentuk warna jingga, kuning, merah tua pada lapisan amil alkohol (Ngajow <i>et al.</i> 2013)	Warna jingga pada lapisan amil alkohol	Positif
Steroid	Terbentuk cincin coklat, merah tua (Ramyashree <i>et al.</i> 2012)	Warna cincin merah tua	Positif
Alkaloid	Terbentuk endapan putih pada reagen Mayer dan merah pada Dragendrof (Alamsyah <i>et al.</i> 2014)	Endapan putih/endapan merah	Positif

Berdasarkan Tabel 8 dapat dilihat bahwa hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun kari positif mengandung saponin, tannin, flavonoid, steroid, dan alkaloid. Hasil uji tabung kandungan kimia ekstrak daun kari dapat dilihat pada lampiran 16.

### 9. Fraksinasi ekstrak daun kari

Ekstrak kental yang diperoleh dari metode maserasi dilakukan fraksinasi dengan tiga pelarut, yaitu pelarut non polar (*n*-heksana), semi polar (etil asetat), dan pelarut polar (air). Hasil persentase rendemen fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dapat dilihat pada Tabel 9.

**Tabel 9. Persentase rendemen fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air**

Fraksi	Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen %
<i>n</i> -heksana	30,00	0,828	2,76
Etil asetat	30,00	1,804	6,01
Air	30,00	26,284	87.61

Berdasarkan Tabel 9 dapat diketahui bahwa perhitungan persentase rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol 70% daun kari yang direplikasi 3 kali adalah 2,76%, 6,01%, dan 87.61%. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol 70% daun kari dapat dilihat pada lampiran 27.

Hasil fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibandingkan fraksi yang lain karena beberapa senyawa dalam daun kari bersifat polar. Tingginya rendemen fraksi pada pelarut polar disebabkan karena makromolekul gula sederhana seperti monosakarida dan oligosakarida ikut terlarut dalam pelarut polar namun tidak larut dalam pelarut non polar (Nur dan Astawan 2011). Hal ini menyebabkan rendemen fraksi air paling besar namun pada fraksi *n*-heksana paling rendah. Hasil rendemen yang diperoleh mendekati 100%. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena ekstrak banyak yang menempel pada wadah dan corong pisah dan kurangnya kekentalan ekstrak untuk proses fraksinasi.

## 10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi dengan mengambil biakan bakteri murni di media NA 2 kali menggunakan jarum Ose, kemudian dipindahkan kedalam tabung yang berisi 5 mL media *Brain Heart Infusion* (BHI) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, selanjutnya divortek dan disetarakan kekeruhan suspensi bakteri sesuai dengan stándart *Mc Farland* 0,5 yang setara dengan  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL untuk difusi, kemudian untuk metode dilusi digunakan suspensi bakteri dengan konsentrasi  $5 \times 10^5$  CFU/mL (CLSI 2012). Hasil pembuatan suspensi bakteri uji dapat dilihat pada lampiran 13.

## 11. Identifikasi bakerti uji *Pseudomonas aeruginosa*

**11.1 Identifikasi bakteri berdasarkan koloni.** Identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan inokulasi secara goresan pada media *Pseudomonas Selektif Agar* kemudian diinkubasi pada suhu

37°C selama 18-24 jam. Hasil penampakan pada media *Pseudomonas Selektif Agar* membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen berwarna kehijauan yang menunjukkan positif *Pseudomonas aeruginosa*. Pigmen warna hijau disebabkan karena *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan pioverdin yang menghasilkan warna kehijauan pada agar (Brook *et al.* 2014). Hasil foto identifikasi bakteri berdasarkan koloni dapat dilihat pada lampiran 14.

**11.2 Identifikasi bakteri berdasarkan morfologi.** Identifikasi morfologi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan cara pewarnaan Gram. identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui pengelompokan bakteri yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pengujian ini dilakukan dengan 4 jenis reagen yaitu Gram A (Kristal Violet), Gram B (Iodine), Gram C (Alkohol) dan Gram D (Safranin).

Pada pewarnaan Gram, bakteri yang telah difiksasi akan membentuk noda pada kaca obyek dengan ditetesi perwarnaan Gram A didiamkan, kemudian dicuci dibawah air mengalir dan pada noda tersebut ditetesi reagen Gram B yang merupakan pewarna *mordant*. Setelah reagen Gram B dicuci dibawah air mengalir, baik bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif akan berwarna ungu. Pewarnaan dilanjutkan dengan reagen Gram C yang merupakan senyawa peluntur, warna yang pada bakteri Gram negatif akan menghilangkan warna ungu dari sel. Setelah reagen Gram C dicuci, pewarna dilanjutkan dengan reagen Gram D yang merupakan pewarna basa berwarna merah. Hasil pengecatan Gram yang dilakukan kemudian diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 100× pada lensa obyektif dengan bantuan minyak emersi.

Hasil pengamatan dibawah mikroskop menunjukkan bahwa bakteri berbentuk batang dan berwarna merah, maka hasil pewarnaan menunjukkan positif bakteri Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*. Warna merah pada bakteri Gram negatif disebabkan oleh rusaknya lapisan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri yang tidak tahan oleh pencucian alkohol (reagen Gram C), sehingga warna cat awal yang merupakan kompleks *cristal violet-iodine* menghilang dan warna safranin reagen (Gram D) yang berwarna merah mampu menyelimuti dinding

peptidoglikan (Partiwi 2008). Hasil identifikasi bakteri berdasarkan pengecatan Gram dapat dilihat pada lampiran 15.

**11.3 Identifikasi bakteri berdasarkan fisiologi.** Identifikasi bakteri berdasarkan fisiologi dengan cara uji biokimia pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan media KIA, SIM, LIA, dan Citrat. Hasil uji biokimia pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat pada tabel 10 dan lampiran 16.

**Tabel 10. Pengujian biokimia bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Media Uji	Hasil	Pustaka (Bonang & Koeswardono 1982)
KIA	Lereng atas berwarna merah (K), bawah berwarna merah (K) dan tidak ada warna hitam (S <sup>-</sup> )	K/K(S <sup>-</sup> )
SIM	Lereng media tidak berwarna hitam (-), tidak terdapat cincin indol berwarna merah (-), ada bakteri yang menyebar (+)	-- +
LIA	Lereng media atas berwarna ungu (K), bawah berwarna ungu (K) dan tidak ada warna hitam (S <sup>-</sup> )	K/K(S <sup>-</sup> )
Citrat	Terjadi perubahan warna biru	Berwarna biru (+)

Pada media KIA didapatkan hasil lereng atas dan lereng bawah berwarna merah (K/K) yang menunjukkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak memfermentasi karbohidrat (glukosa dan laktosa) dan tidak terdapat warna hitam sebagai tanda tidak terjadi pembentukan sulfida (S<sup>-</sup>) artinya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak memproduksi H<sub>2</sub>S. Pada media SIM didapatkan hasil pada media tidak terdapat warna hitam (S<sup>-</sup>) artinya *Pseudomonas aeruginosa* tidak mampu mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida sehingga media tidak berwarna hitam. Uji indol negatif artinya tidak terbentuk cincin indol yang berwarna merah setelah ditetaskan reagen erlich A dan erlich B karena tidak terjadi pemecahan asam amino tritofan oleh enzim tritopanase menjadi indol dan asam piruvat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak menghasilkan triptopanase, dan motilitas positif artinya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* bersifat motil, ditunjukkan dengan pertumbuhan bakteri

*Pseudomonas aeruginosa* menyebar keseluruh medium. Pada media LIA didapatkan hasil bahwa lereng atas berwarna ungu (K/K) artinya bakteri tidak mendeaminasi lysin dan tidak terdapat warna hitam sebagai tanda tidak terjadi pembentukan sulfida (S<sup>-</sup>) artinya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak memproduksi H<sub>2</sub>S. pada media citrat didapatkan hasil media berwarna biru (+) karena pH meningkat menjadi basah artinya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan media citrat sebagai sumber karbon tunggal.

## 12. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara difusi

Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dilakukan dengan cara menempelkan kertas cakram yang telah berisi ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air ke atas permukaan media MHA yang telah ditumbuhkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Data yang didapat dianalisis menggunakan SPSS uji *One Way Anova*.

**Tabel 11. Uji aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 metode difusi**

Konsentrasi	Sampel	Diameter Hambat (mm)			
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata ± SD
Konsentrasi 20%	Ekstrak	12,5	12	13	12,5±0,5
	<i>n</i> -heksana	8,5	9	9	8,83±0,57
	Etil asetat	14	14	15	14,33±0,57
	Air	9	9,5	9	9,16±0,28
Konsentrasi 10%	Ekstrak	10	11	10,5	10,5±0,5
	<i>n</i> -heksana	7,5	8	8	7,83±0,28
	Etil asetat	12	12,5	12	12,16±0,28
	Air	8	8	7,5	7,83±0,28
Konsentrasi 5%	Ekstrak	8,5	8	9	8,5±0,5
	<i>n</i> -heksana	7,5	7	8	7,5±0,5
	Etil asetat	10,5	10	10,5	10,33±0,28
	Air	7,5	7,5	8	7,66±0,28
Kontrol (-)	DMSO 5%	0	0	0	0±0
Kontrol (+)	Gentamisin 10µg	17	17	17	17±0

Berdasarkan Tabel 11. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat konsentrasi 20% merupakan fraksi yang memiliki diameter daya hambat terbesar dalam menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

27853. Kontrol positif (gentamisin 10 $\mu$ g) terbukti efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan diameter daya hambat rata-rata paling besar dibandingkan dengan fraksi teraktif (fraksi etil asetat 20%) yaitu sebesar 17 mm. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sensitif terhadap antibiotik gentamicin 10 $\mu$ g dengan zona hambat >17 mm (CLSI 2016). Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 metode difusi dapat dilihat pada lampiran 17.

Hasil dari uji difusi dari tabel diatas diuji kebenarannya menggunakan uji SPSS *one way anova*. Uji ini digunakan untuk membandingkan sampel pada tiap konsentrasi. Data yang dianalisis dengan *one way anova* adalah konsentrasi 20%, 10%, dan 5% dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, kontrol positif (gentamisin), dan kontrol negatif (DMSO 5%). Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air kontrol positif dan kontrol negatif untuk mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji *One-Sampel Kormogorov Sminorv* menunjukkan bahwa nilai signifikansinya sebesar  $1,292 > 0,05$  maka  $H_0$  diterima artinya data yang diuji terdistribusi normal. Berdasarkan uji tersebut data terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan *Analysis of Varians* (ANOVA). Berdasarkan tabel *Tukey test* menunjukkan tanda (\*) pada angka *mean difference*, artinya hasil diameter zona hambat ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, kontrol positif, dan kontrol negatif menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Analisis *Homogeneous Subtest* ini untuk mencari subset mana yang mempunyai perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *homogeneous* terbagi dalam 8 subset, Berdasarkan data tersebut dapat diketahui fraksi etil asetat 20% merupakan fraksi teraktif, diameter zona hambat konsentrasi 20% lebih besar dibanding 10% dan 5%, hal ini dikarenakan etil asetat 20% lebih banyak mengandung zat aktif yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Berbagai subset diketahui subset 1 sampai subset 8 mempunyai

beda nyata secara signifikan dalam penghambatan aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat lampiran 31.

Fraksi etil asetat memiliki zona hambat yang paling besar dibandingkan fraksi *n*-heksana, dan air. Fraksi etil asetat mengandung senyawa kimia yang kompleks dan memiliki aktivitas antibakteri dibandingkan pada non polar dan polar, diduga karena etil asetat bersifat semi polar yang dapat melarutkan senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin (Putri *et al.*2013), fraksi *n*-heksana yang bersifat non polar dapat melarutkan senyawa steroid/triterpenoid (Yusnawan 2013) dan fraksi air karena sifatnya polar senyawa yang larut dalam adalah glikosida, saponin, dan tanin (Depkes 1986). Hal tersebut mengakibatkan fraksi etil asetat menjadi fraksi teraktif dengan membentuk daya hambat paling besar dibandingkan fraksi *n*-heksana dan fraksi air.

### **13. Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara dilusi**

Pengujian aktivitas antibakteri dilanjutkan dengan metode dilusi dari sediaan uji yang paling efektif dalam menghambat aktifitas antibakteri dari hasil uji difusi yaitu fraksi etil asetat konsentrasi 20%. Uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi dilakukan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan konsentrasi 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156, 0,078, 0,039 serta kontrol (+), dan kontrol (-). Kontrol positif menggunakan suspensi bakteri yang telah distandar *Mc Farland* 0,5  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL menjadi  $5 \times 10^5$  CFU/mL yang berarti pengenceran 1:1000 dan kontrol negatif menggunakan fraksi teraktif etil asetat 20%. KHM ditandai dengan mulai adanya kejernihan secara visual (Partiwi 2008). Pada penelitian ini, nilai KHM fraksi etil asetat konsentrasi 20% dari ekstrak etanol 70% daun kari tidak dapat ditentukan karena fraksi yang digunakan terlalu pekat atau berwarna gelap sehingga sulit dibedakan antara keruh atau tidak, karena itu untuk mengetahui nilai KBM semua seri pengenceran yang berisi fraksi etil asetat dan suspensi bakteri diinokulasikan pada media *Pseudomonas Selektif Agar*. Hasil nilai KBM dari fraksi etil asetat konsentrasi 20% dapat dilihat pada Tabel 12.

**Tabel 12. Nilai KBM fraksi teraktif daun kari terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Konsentrasi %	Fraksi etil asetat		
	Replikasi		
	1	2	3
Kontrol (-)	-	-	-
20%	-	-	-
10%	-	-	-
5%	-	-	-
2,5%	-	-	-
1,25%	-	-	-
0,625%	+	+	+
0,312%	+	+	+
0,156%	+	+	+
0,078%	+	+	+
0,039%	+	+	+
Kontrol (+)	+	+	+

\*- : Tidak ada pertumbuhan bakteri, + : Ada pertumbuhan bakteri, Kontrol (-) : Larutan stok fraksi etil asetat 20%, Kontrol (+) : Suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Berdasarkan Tabel 12 menunjukkan bahwa konsentrasi fraksi etil asetat 20%, 10%, 5%, 2,5%, dan 1,25% menunjukkan hasil negatif yang berarti tidak terdapat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada media *Pseudomonas Selektif Agar*, sedangkan pada konsentrasi fraksi etil asetat 0,625%, 0,312%, 0,156%, 0,078%, dan 0,039% menunjukkan hasil positif yang berarti terdapat pertumbuhan bakteri pada media, maka dapat diketahui nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat adalah 1,25% yang merupakan konsentrasi terendah dari fraksi etil asetat yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hasil goresan dilusi dapat dilihat pada lampiran 19.

#### **14. Hasil identifikasi kandungan senyawa dari fraksi teraktif daun kari menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT)**

Identifikasi kandungan kimia secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun kari. Senyawa yang diuji adalah saponin, tanin, flavonoid, steroid, dan

alkaloid. Fase diam menggunakan silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak sesuai dengan senyawa yang diidentifikasi Kemudian di liat noda bercak pada sinar UV 254 dan UV 366 dan hitung nilai Rf tiap bercak noda yaitu titik asal dibagi dengan jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal.

**Tabel 13. Identifikasi kandungan senyawa dari fraksi teraktif daun kari metode kromatografi lapis tipis**

Sampel	Kode	Rf	Warna noda			
			Visual	Visual preakasi pemprot	UV 254 nm	UV 366 nm
<b>Saponin</b>						
Baku	A <sub>1</sub>	0,7	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Ungu	Tidak berwarna
Fraksi etil asetat	B <sub>1</sub>	0,7	Kecoklatan	Kuning kecoklatan	Ungu	Tidak berwarna
<b>Tanin</b>						
Baku	A <sub>1</sub>	0,8	Kecoklatan	Hitam	Hitam	Hitam
Fraksi etil asetat	B <sub>1</sub>	0,8	Kecoklatan	Hitam	Hitam	Hitam
<b>Flavonoid</b>						
Baku	A <sub>1</sub>	0,46	Kuning	Kuning	Hijau tua	Biru gelap
Fraksi etil asetat	B <sub>1</sub>	0,5	Kuning	Kuning	Hijau tua	Biru gelap
	B <sub>2</sub>	0,96	Hijau	Hijau	Hijau gelap	Merah tua
<b>Steroid</b>						
Baku	A <sub>1</sub>	0,72	Tidak berwarna	Ungu	Biru	Hijau
Fraksi etil asetat	B <sub>1</sub>	0,8	Kuning kehijauan	Hijau kebiruan	Hijau	Merah tua
	B <sub>2</sub>	0,94	Kuning kehijauan	Hijau tua	Hijau gelap	Merah gelap
<b>Alkaloid</b>						
Baku	A <sub>1</sub>	0,84	Tidak berwarna	Jingga	Kuning	Merah tua
Fraksi etil asetat	B <sub>1</sub>	0,82	Kuning	Jingga	Kuning	Merah tua
	B <sub>2</sub>	0,92	Kecoklatan	Kecoklatan	Hitam	Hitam

**14.1 Identifikasi saponin.** Identifikasi senyawa saponin menggunakan fase gerak kloroform: metanol: air (13:7:2) dan baku pembanding gliserisin, setelah terelusi menunjukkan hasil pada sinar tampak tidak terlihat bercak noda pada baku pembanding sedangkan sampel terlihat bercak noda kecoklatan, sinar 254 nm keduanya terlihat bercak noda berwarna ungu dan 366 nm terlihat tidak

terlihat bercak noda pada sampel sedangkan baku pembanding tidak terlihat. Penyemprotan dengan Lieberman Burchard bercak noda baku pembanding masih tidak terlihat dan sampel berubah menjadi agak kuning kecoklatan, sinar 254 nm keduanya terlihat bercak noda lebih berwarna ungu dan 366 nm tidak terlihat bercak noda pada sampel sedangkan baku pembanding tidak terlihat noda. Bercak-bercak noda dilingkari dengan pensil dan dihitung nilai Rf. Nilai Rf baku pembanding A<sub>1</sub> adalah 0,7, sedangkan nilai Rf sampel B<sub>1</sub> adalah 0,7. Nilai Rf A<sub>1</sub> dan B<sub>1</sub> mempunyai nilai Rf yang sama, menandakan bahwa sampel mengandung senyawa saponin.

**14.2 Identifikasi tanin.** Identifikasi senyawa tanin menggunakan fase gerak *n*-heksana: etil asetat (6:4) dan baku pembanding asam galat, setelah bercak terelusi menunjukkan hasil pada sinar tampak terlihat bercak noda kecoklatan pada baku pembanding dan sampel, sinar UV 254 bercak noda berwarna biru pada baku pembanding dan sampel, sinar UV 366 bercak noda baku pembanding berwarna biru dan sampel berwarna biru gelap, setelah penyemprotan dengan FeCl<sub>3</sub> 5% noda bercak baku pembanding dan sampel berubah menjadi berwarna hitam pada sinar tampak, kemudian dilihat sinar UV 254 nm dan 366 nm terlihat noda berwarna hitam. Bercak-bercak noda yang terbentuk dilingkari dengan pensil dan dihitung nilai Rf. Hasil nilai Rf pada baku pembanding A<sub>1</sub> adalah 0,8, sedangkan nilai Rf sampel B<sub>1</sub> adalah 0,8. Nilai Rf A<sub>1</sub> dengan B<sub>1</sub> mempunyai nilai Rf yang sama, menandakan bahwa sampel mengandung senyawa tanin.

**14.3 Identifikasi flavonoid.** Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan fase gerak butanol: asam glisial: air (4:1:5) dan baku pembanding rutin, setelah bercak noda terelusi menunjukkan pada sinar tampak terlihat bercak noda berwarna kuning pada baku pembanding dan bercak noda pada sampel ada dua berwarna kuning dan hijau, sinar UV 254 nm baku pembanding dan sampel bercak noda berwarna hijau, dan sinar UV 366 nm baku pembanding dan sampel bercak noda berwarna biru gelap, setelah penyemprotan dengan Sitroborat, pada sinar tampak bercak noda baku pembanding terlihat berwarna kuning dan sampel bercak noda berwarna kuning dan hijau, sinar UV 254 nm baku pembanding dan sampel terlihat bercak noda berwarna hijau gelap, dan sinar UV 366 baku

pembandingan bercak noda berwarna biru gelap dan sampel bercak noda berwarna biru gelap dan merah tua. Bercak-bercak noda yang terbentuk dilingkari dengan pensil dan hitung nilai Rf. Hasil nilai  $A_1$  pada baku pembandingan adalah 0,46 dan nilai Rf sampel  $B_1$  adalah 0,5 dan  $B_2$  adalah 0,96. Nilai Rf  $A_1$  dan  $B_1$  memiliki nilai Rf yang mendekati menandakan bahwa sampel mengandung senyawa flavonoid.

**14.4 Identifikasi steroid.** Identifikasi senyawa steroid menggunakan fase gerak kloroform: etanol (9:1) dan baku pembandingan stigmasterol, setelah terelusi menunjukkan pada sinar tampak hanya terlihat dua bercak noda berwarna kuning kehijauan pada sampel, sinar UV 254 nm hanya terlihat bercak noda pada sampel berwarna hijau dan hitam, sinar UV 366 nm hanya terlihat bercak noda berwarna hitam, setelah penyemprotan Liebermen Burchad disertai dengan pemanasan di oven pada suhu 105°C selama 1 menit. pada sinar tampak terlihat bercak noda berwarna ungu pada baku pembandingan, sedangkan sampel berwarna hijau gelap, sinar UV 254 nm terlihat bercak noda biru pada baku pembandingan, sedangkan sampel berwarna hijau pekat, dan sinar UV 366 nm terlihat bercak noda berflourensi berwarna hijau pada baku pembandingan, sedangkan sampel bercak noda merah tua dan merah gelap. Bercak-bercak noda yang terbentuk dilingkari dengan pensil dan hitung nilai Rf. Hasil nilai  $A_1$  pada baku pembandingan adalah 0,72 dan nilai Rf sampel  $B_1$  adalah 0,8 dan  $B_2$  adalah 0,94. Nilai Rf  $A_1$  dan nilai  $B_1$  atau  $B_2$  tidak memiliki nilai Rf yang mendekati atau sama menandakan bahwa sampel tidak mengandung senyawa steroid.

**14.5 Identifikasi alkaloid.** Identifikasi senyawa alkaloid menggunakan fase gerak *n*-heksana: etil asetat (6:4) dan baku pembandingan papaverin, setelah bercak terelusi menunjukkan hasil pada sinar tampak, hanya terlihat dua bercak noda kuning dan coklat pada sampel, sinar UV 255 nm bercak noda pada baku pembandingan terlihat berwarna biru dan noda bercak pada sampel berwarna hijau dan biru, sinar UV 366 nm hanya terbentuk bercak noda berwarna hitam pada sampel. Setelah penyemprotan dengan Dragendrof noda bercak baku pembandingan berubah berwarna jingga dan sampel berubah menjadi berwarna jingga dan coklat pada sinar tampak, kemudian dilihat sinar UV 254 nm berwarna kuning pada baku

pembandingan dan sampel berwarna kuning dan hitam dan sinar UV 366 nm terlihat bercak noda berwarna merah tua pada baku pembandingan dan sampel. Bercak-bercak noda yang terbentuk dilingkari dengan pensil dan dihitung nilai Rf. Hasil nilai Rf pada baku pembandingan A<sub>1</sub> adalah 0,84, sedangkan nilai Rf sampel pada B<sub>1</sub> adalah 0,82 dan B<sub>2</sub> adalah 0,92. Nilai Rf A<sub>1</sub> dengan B<sub>1</sub> mempunyai nilai Rf yang sama, menandakan bahwa sampel mengandung senyawa alkaloid.

Berdasarkan hasil uji identifikasi kandungan senyawa fraksi etil asetat menggunakan kromatografi lapis tipis serta dihitung nilai Rf tiap bercak noda, nilai Rf yang baik antara 0,2-0,8 (Gandjar & Rohman 2017). Menunjukkan bahwa positif mengandung saponin, tanin, flavonoid dan alkaloid. Hasil identifikasi kromatografi lapis tipis dan hasil perhitungan nilai Rf noda bercak senyawa saponin, tanin, flavonoid, dan alkaloid dapat dilihat pada lampiran 12.

Senyawa-senyawa tersebut mempunyai mekanisme kerja antibakteri yaitu, senyawa saponin mekanisme kerjanya merusak membran sitoplasma dapat mengakibatkan sifat permeabilitas membran sel berkurang sehingga transport zat ke dalam sel dan ke luar sel menjadi tidak terkontrol, Zat yang berada di dalam sel seperti ion organik, enzim, asam amino, dan nutrisi dapat keluar, selanjutnya pertumbuhan sel bakteri menjadi terhambat dan menyebabkan kematian sel (Antika *et al.* 2014). Senyawa tanin mekanisme kerjanya menyerang polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna, menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Sari & Sari 2011). Senyawa flavonoid mekanisme kerjanya membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraselular (Nuria *et al.* 2009). Senyawa alkaloid mekanismenya dengan cara mengganggu komponen peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara sempurna dan menyebabkan kematian sel tersebut (Darsana *et al.* 2012).

