

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah daun stevia yang diperoleh dari Desa Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Januari 2019. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun stevia. Daun stevia yang diambil yaitu berwarna hijau, segar, terbebas dari hama dan dipanen saat umur dua bulan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun stevia.

Variabel utama yang kedua pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol serta fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun stevia terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun stevia dalam berbagai konsentrasi.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *P. aeruginosa* ATCC 27853, ekstrak dan fraksi daun stevia, serta kondisi laboratorium (semua alat dan bahan yang digunakan harus dalam keadaan steril).

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam suatu penelitian. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun stevia terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun stevia adalah bagian dari tanaman stevia yang diperoleh dari hasil pemetikan.

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

Ketiga, ekstrak etanol daun stevia adalah hasil ekstraksi dengan metode maserasi dan menggunakan pelarut etanol 70%. Hasil ekstrak dipekatkan dengan cara diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator*.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah hasil fraksinasi dari ekstrak etanol daun Stevia menggunakan pelarut *n*-heksana yang bersifat non polar, kemudian dipekatkan di oven.

Kelima, fraksi etil asetat adalah hasil fraksinasi dari residu fraksi *n*-heksana menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar, kemudian dipekatkan di oven.

Keenam, fraksi air adalah hasil fraksinasi dari residu fraksi etil asetat menggunakan pelarut air yang bersifat polar, kemudian dipekatkan di oven.

Ketujuh, *P. aeruginosa* ATCC 27853 merupakan bakteri Gram-negatif yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, metode difusi adalah uji aktivitas antibakteri dengan tiga seri konsentrasi pada masing-masing ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun stevia yaitu 12,5, 25 dan 50%.

Kesembilan, metode dilusi adalah uji aktivitas antibakteri berupa seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125%; 1,562; 0,781; 0,390; 0,195 dan 0,0975%.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan serta analisis serbuk simplisia meliputi timbangan, oven, alat penggiling (*hammer mill*), ayakan nomor 40, blender, neraca analitik, *moisture balance*, dan *Sterling Bidwell*.

Alat yang digunakan untuk proses maserasi dan fraksinasi meliputi gelas ukur, botol kaca coklat, kain flanel, *rotary evaporator*, oven, corong pisah, corong kaca, dan kertas saring.

Alat untuk identifikasi kandungan senyawa meliputi gelas ukur, erlenmeyer, *beaker glass*, batang pengaduk, pipet tetes, dan tabung reaksi, lempeng silika gel GF₂₅₄, dan *chamber* KLT.

Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri meliputi inkas, autoklaf, oven, jarum Ose, jarum end, kapas lidi steril, cawan petri, pipet volume, pipet mikro, pipet tetes, tabung reaksi, *beaker glass*, gelas ukur, kaca objek, pinset, mikroskop, dan penggaris.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.).

Bahan kimia yang digunakan yaitu etanol 70%, *n*-heksana, etil asetat, *aqua destilata*, toluen, HCl, pereaksi Dragendorf, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi sitroborat, pereaksi Liebermann Burchard, pereaksi FeCl₃, baku pembanding rutin, gliserisin, asam galat, papaverin, stigmasterol, CH₃COOH, H₂SO₄, serbuk magnesium, kristal violet (Gram A), lugol iodin (Gram B), alkohol 95% (Gram C), safranin (Gram D), reagen Erlich A dan B, DMSO, larutan standard *Mc Farland*, dan cakram antibiotik gentamisin 10 µg.

Bakteri uji pada penelitian ini adalah *P. aeruginosa* ATCC 27853. Medium yang digunakan yaitu *Brain Heart Infusion* (BHI), *Pseudomonas Selective Agar* (PSA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Kligler Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), dan *Citrate Agar*.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman stevia

Tahap pertama pada penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun stevia dengan cara mencocokkan deskripsi morfologis yang ada pada tanaman terhadap kepustakaan yang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

2. Pengeringan dan pembuatan serbuk daun stevia

Daun stevia sebelumnya dicuci menggunakan air bersih mengalir untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada daun, kemudian daun dikeringkan di oven pada suhu 50°C. Simplisia yang sudah kering diserbuk dengan alat penggiling, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 dan disimpan dalam wadah yang kering serta ditutup rapat.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun stevia

Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk menggambarkan zat yang menghilang selama proses pemanasan, tidak hanya menggambarkan air yang hilang tetapi juga zat mudah menguap lain yang hilang. Penetapan ini dilakukan pada suhu 105°C sampai bobot konstan, dan dinyatakan dalam persen (Depkes RI 2000). Penetapan susut pengeringan pada penelitian ini dilakukan dengan alat Moisture balance. Prosedurnya adalah, serbuk ditimbang langsung pada alat sebanyak 2 gram, kemudian alat ditutup dan ditunggu sampai terdapat bunyi pada alat yang menandakan proses telah selesai. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat dicatat sebagai susut pengeringan.

4. Pembuatan ekstrak daun stevia

Pembuatan ekstrak daun stevia dilakukan dengan metode maserasi dengan perbandingan 10:100, yang artinya 10 bagian (gram) serbuk simplisia : 100 bagian (mL) pelarut. Pelarut atau cairan penyari yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%. Serbuk sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam botol kaca gelap, kemudian dituangi 75 bagian atau sebanyak 3750 mL pelarut, botol ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya matahari sambil diaduk berulang-ulang. Setelah direndam 5 hari, ampas disaring dengan kain flanel. Ampas

dicuci dengan sisa pelarut yaitu 25 bagian atau sebanyak 1250 mL, kemudian diaduk dan direndam, sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Botol ditutup dan dibiarkan selama 2 hari terlindung dari cahaya matahari, tanpa dilakukan pengadukan. Setelah direndam 2 hari, ampas disaring dengan kain flanel. Hasil penyarian pertama dan kedua ditampung, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan oven, sehingga didapatkan ekstrak kental. Rendemen diperoleh dari hasil ekstrak pekat dibagi dengan berat awal serbuk, lalu dikalikan 100%.

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot ekstrak pekat (g)}}{\text{Bobot awal serbuk (g)}} \times 100\%$$

5. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun stevia

Penetapan kadar air pada penelitian ini menggunakan metode destilasi dengan alat *Sterling Bidwell*. 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). Prosedurnya yaitu, pertama tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan asam pencuci, lalu dibilas dengan air dan dikeringkan dalam lemari pengering. Bahan ditimbang saksama yang diperkirakan mengandung 2 mL sampai 4 mL air, kemudian dimasukkan ke dalam labu kering yang sebelumnya sudah dimasukkan batu didih untuk mencegah letupan akibat panas. Toluena jenuh air sebanyak 200 mL ditambahkan ke dalam labu, kemudian rangkaian alat dipasang. Labu dipanaskan hingga semua air terdestilasi atau air pada penampung tidak bertambah lagi. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluena jenuh air sambil dibersihkan dengan sikat yang telah dibasahi dengan toluena jenuh air, kemudian penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Setelah selesai, tabung penerima didinginkan pada suhu ruang. Jika ada tetes air yang melekat, tabung pendingin dan tabung penerima digosok dengan karet yang diikatkan pada kawat tembaga dan dibasahi dengan toluena jenuh air hingga tetesan air turun. Volume air pada penampung dibaca setelah air dan toluena terpisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (Depkes RI 2000 & Kemenkes RI 2011).

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{\text{Volume air (mL)}}{\text{Bobot awal serbuk (g)}} \times 100\%$$

6. Uji bebas etanol ekstrak daun stevia

Uji bebas etanol pada ekstrak daun stevia dilakukan untuk memastikan bahwa ekstrak yang akan digunakan untuk penelitian antibakteri ini benar-benar bebas dari kandungan etanol, karena diketahui bahwa etanol memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Uji ini dilakukan dengan cara, sedikit ekstrak kental dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan CH_3COOH pekat dan H_2SO_4 pekat dan dipanaskan. Hasil uji bebas etanol ekstrak ditandai dengan tidak adanya bau ester. Ester dihasilkan dari reaksi esterifikasi antara alkohol dengan asam karboksilat pada suasana asam (Susilo *et al.* 2017).

7. Fraksinasi ekstrak daun stevia

Fraksinasi ekstrak daun stevia dilakukan dengan cara, ditimbang 10 gram ekstrak kental di dalam *beaker glass*, kemudian dilarutkan dengan *aqua destilata* sebanyak 75 mL, lalu dipindahkan ke dalam corong pisah. *n*-Heksana sebanyak 75 mL ditambahkan ke dalam corong pisah, lalu difraksinasi hingga terbentuk dua fase yaitu fase air dan fase *n*-heksana, kemudian kedua fase tersebut dipisahkan. Proses tersebut diulangi sebanyak 5 kali dengan penambahan *n*-heksana 75 mL terhadap fase air. Seluruh fase *n*-heksana yang didapat, ditampung dan dipekatkan di oven. Fase air dilanjutkan fraksinasi dengan pelarut etil asetat sebanyak 75 mL. Fraksinasi diulangi sebanyak 5 kali dengan penambahan etil asetat 75 mL terhadap fase air. Seluruh fase etil asetat yang didapat, ditampung dan dipekatkan di oven. Fase air ditampung dan dipekatkan di oven. Semua fraksi yang didapat, kemudian ditimbang.

8. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun stevia

Identifikasi kandungan kimia bertujuan menetapkan kebenaran golongan senyawa pada ekstrak daun stevia. Identifikasi yang dilakukan meliputi identifikasi golongan senyawa alkaloid, steroid, tanin, saponin dan flavonoid.

8.1 Alkaloid. Ekstrak daun stevia ditimbang sebanyak 0,5 gram dan ditambah dengan 5 mL HCl 1% di dalam *beaker glass*, kemudian dipanaskan di atas *waterbath* dan disaring. Hasil filtrat dibagi 3 sama banyak di dalam tabung, kemudian masing-masing ditetesi dengan reagen Dragendorf, Mayer dan Wagner.

Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih dengan reagen Mayer, endapan jingga hingga merah dengan reagen Dragendorf, dan endapan merah kecoklatan dengan reagen Wagner (Fajriaty *et al.* 2018).

8.2 Steroid. Ekstrak daun stevia ditimbang sebanyak 0,5 gram, ditambahkan asam asetat anhidrida di dalam tabung reaksi, lalu ditambah kloroform, kemudian diberi H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung secara perlahan. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya cincin steroid berwarna coklat kemerahan pada batas kedua larutan (Siddique *et al.* 2014).

8.3 Tanin. Ekstrak daun stevia ditimbang sebanyak 0,5 gram, lalu dilarutkan dengan *aqua destilata* secukupnya di dalam tabung reaksi. Larutan disaring, kemudian filtrat ditetesi FeCl₃. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman yang menunjukkan tanin katekol dan warna biru kehitaman yang menunjukkan tanin pirogalol (Lallo *et al.* 2018).

8.4 Saponin. Ekstrak daun stevia ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dilarutkan dengan *aqua destilata* secukupnya di dalam tabung reaksi. Tabung reaksi dikocok kuat dan ditambahkan HCl 2 N. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya buih pada permukaan cairan yang stabil (Minarno 2016).

8.5 Flavonoid. Ekstrak daun stevia ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dilarutkan dengan *aqua destilata* secukupnya di dalam tabung reaksi, lalu dipanaskan dan disaring. Filtrat dalam tabung ditambahkan serbuk Mg, HCl pekat dan amil alkohol, kemudian dikocok dan dibiarkan memisah. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Mentari *et al.* 2016).

9. Sterilisasi

Media biakan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit. Autoklaf merupakan sterilisasi yang memanfaatkan uap air panas bertekanan tinggi untuk peralatan maupun bahan yang dapat ditembus oleh air dan tidak rusak oleh panas (Sumarsih 2010 & Gunawan 2008). Peralatan yang terbuat dari kaca seperti cawan petri, *beaker glass*, gelas ukur, lidi steril dan tabung reaksi, disterilisasi dengan oven pada suhu 160-180°C selama 1-2 jam (Darmadi 2008). Peralatan lainnya seperti kaca objek, jarum Ose, jarum end, pipet tetes, dan pinset

disterilisasi dengan cara fiksasi menggunakan lampu spiritus. Inkas disterilisasi dengan alkohol.

10. Pembuatan suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Bakteri uji *P. aeruginosa* diambil dari biakan murni sebanyak satu jarum Ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium BHI dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, kemudian disetarakan kekeruhannya dengan standar *Mc Farland* 0,5 agar jumlah bakteri setara dengan $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Penyetaraan dilakukan dengan cara penambahan medium BHI pada suspensi bakteri hingga kekeruhannya sama dengan standar *Mc Farland* 0,5.

11. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

11.1 Identifikasi makroskopis. Bakteri uji *P. aeruginosa* digores dengan jarum Ose pada permukaan medium PSA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. *P. aeruginosa* memiliki pigmen piosianin yang menghasilkan koloni berwarna hijau.

11.2 Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara, biakan bakteri *P. aeruginosa* dicampur dengan tetesan air steril di atas kaca objek, kemudian disebar di tengah kaca objek hingga membentuk lapisan tipis, lalu difiksasi. Kristal violet ditambahkan di atas kaca objek hingga menggenangi olesan bakteri, kemudian didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan *aqua destilata* mengalir, dan dikering anginkan. Larutan yodium ditambahkan di atas kaca objek, didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan *aqua destilata* mengalir, dan dikering anginkan. Alkohol 95% sebagai larutan pemucat ditambahkan tetes demi tetes hingga warna ungu pada kaca objek tidak terlihat lagi, kemudian dicuci dengan *aqua destilata* mengalir, dan dikering anginkan. Kaca objek digenangi lagi dengan safranin selama 1 menit, kemudian dicuci dengan *aqua destilata* mengalir dan dikering anginkan. Kaca objek yang sudah kering, diberi minyak emersi dan diamati di mikroskop (Prihanto *et al.* 2018). Bakteri *P. aeruginosa* yang merupakan bakteri Gram-negatif, akan memberikan warna merah muda karena memiliki peptidoglikan yang tipis, sehingga menyebabkan warna sedikit luntur saat pemberian alkohol dan terwarnai

oleh safranin (Dwita *et al.* 2018). Morfologi bakteri *P. aeruginosa* yaitu berbentuk batang, tampak dalam bentuk tunggal atau berpasangan, dan kadang-kadang berantai pendek (Sastrahidayat 2015).

11.3 Uji biokimia. Sifat fisiologi bakteri *P. aeruginosa* dapat diketahui dengan uji biokimia. Medium yang digunakan untuk uji biokimia yaitu KIA, SIM, LIA, dan *Citrate*.

11.3.1 *Kligler Iron Agar (KIA)*. Uji KIA bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, asam dan gas (Harti 2015). Biakan bakteri *P. aeruginosa* diinokulasikan pada medium KIA dengan cara tusuk gores, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif untuk bakteri *P. aeruginosa* adalah K/KS⁻. Bagian lereng medium berwarna merah ditulis K, bagian dasar medium berwarna merah ditulis K, dan tidak terbentuk sulfida berwarna hitam ditulis S⁻ (Sulviana *et al.* 2017).

11.3.2 *Sulfide Indol Motility (SIM)*. Uji SIM bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas. Biakan bakteri *P. aeruginosa* diinokulasikan pada medium SIM dengan cara ditusuk, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif untuk bakteri *P. aeruginosa* adalah tidak terbentuk sulfida berwarna hitam ditulis (-), tidak terbentuk cincin indol berwarna merah setelah penambahan erlich A dan B (1:1) ditulis (-), dan adanya motilitas ditulis (+). Motilitas ditandai dengan kekeruhan pada seluruh medium yang menunjukkan pertumbuhan dan penyebaran bakteri (Sulviana *et al.* 2017).

11.3.3 *Lysine Iron Agar (LIA)*. Uji LIA bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, deaminasi atau dekarboksilasi lisin (Harti 2015). Biakan bakteri *P. aeruginosa* diinokulasikan pada medium LIA dengan cara tusuk gores, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif untuk bakteri *P. aeruginosa* adalah K/KS⁻. Bagian lereng medium berwarna ungu ditulis K, bagian dasar medium berwarna ungu ditulis K, dan tidak terbentuk sulfida berwarna hitam ditulis S⁻ (Sulviana *et al.* 2017).

11.3.4 *Citrate Agar*. Biakan bakteri *P. aeruginosa* diinokulasikan pada medium *Citrate Agar* dengan cara tusuk gores, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif untuk bakteri *P. aeruginosa* menunjukkan adanya

perubahan warna media dari hijau menjadi biru yang disebabkan oleh peningkatan pH media di atas 7,6 karena adanya ammonia yang berasal dari monoammonium pospat yang terdapat pada media (Sulviana *et al.* 2017).

12. Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi

Metode difusi pada penelitian ini bertujuan untuk menentukan fraksi teraktif daun stevia sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853, kemudian dilanjutkan dengan metode dilusi. Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun Stevia dibuat masing-masing tiga seri konsentrasi yaitu 12,5, 25 dan 50% dengan pengencer yang sesuai. Disiapkan 3 cawan petri steril yang berisi medium MHA sebanyak 50 mL. Seluruh medium diberi biakan bakteri *P. aeruginosa* dengan cara perataan, didiamkan sekitar 10-15 menit agar bakteri terdifusi ke dalam medium, kemudian dibuat 6 bagian untuk menempatkan cakram. Cakram yang berisi bahan sampel, dibuat dengan cara memberikan larutan sampel sebanyak 30 μ L pada cakram kosong sesuai konsentrasi. Bagian 1 diisi dengan cakram ekstrak konsentrasi 12,5, 25 dan 50% pada masing-masing medium. Bagian 2 diisi dengan cakram fraksi *n*-heksana konsentrasi 12,5, 25 dan 50% pada masing-masing medium. Bagian 3 diisi dengan cakram fraksi etil asetat konsentrasi 12,5, 25 dan 50% pada masing-masing medium. Bagian 4 diisi dengan cakram fraksi air konsentrasi 12,5, 25 dan 50% pada masing-masing medium. Bagian 5 diisi dengan cakram DMSO 5% sebagai kontrol negatif, dan satu bagian yang tersisa diisi cakram antibiotik gentamisin 10 μ g sebagai kontrol positif. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diamati dan diukur diameter zona hambat berupa zona yang jernih disekitar lubang sumuran yang dinyatakan dalam satuan mm. Pengujian dilakukan secara aseptis dan direplikasi sebanyak 3 kali.

13. Identifikasi kandungan kimia fraksi teraktif daun stevia secara KLT

Identifikasi kandungan kimia secara KLT ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa apa saja yang terdapat fraksi teraktif daun stevia. Identifikasi yang dilakukan meliputi identifikasi golongan senyawa alkaloid, steroid, tanin, saponin dan flavonoid.

13.1 Alkaloid. Identifikasi secara KLT dilakukan dengan cara, fraksi teraktif daun stevia dan baku pembanding papaverin ditotolkan pada fase diam silika gel GF₂₅₄, lalu dielusi dengan fase gerak etil asetat-metanol-air perbandingan 90:9:1 (Nilesh *et al.* 2018). Bercak diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, serta pereaksi Dragendorff. Alkaloid menunjukkan peredaman di bawah sinar UV 254 nm, berfluoresensi biru di bawah sinar UV 366 nm, dan memberikan warna jingga atau coklat setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff (Anggia *et al.* 2016).

13.2 Steroid. Identifikasi secara KLT dilakukan dengan cara, fraksi teraktif daun stevia dan baku pembanding stigmasterol ditotolkan pada fase diam silika gel GF₂₅₄, lalu dielusi dengan fase gerak *n*-heksana-etil asetat perbandingan 6:4. Bercak diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, serta pereaksi Liebermann Burchard. Steroid memberikan warna biru atau ungu setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann Burchard dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 menit (Fajriaty *et al.* 2018).

13.3 Tanin. Identifikasi secara KLT dilakukan dengan cara, fraksi teraktif daun stevia dan baku pembanding asam galat ditotolkan pada fase diam silika gel GF₂₅₄, lalu dielusi dengan fase gerak *n*-butanol-asam asetat-air perbandingan 4:1:5. Bercak diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, dengan sinar tampak, serta pereaksi FeCl₃ 1% (Carvalho *et al.* 2018). Tanin menunjukkan peredaman di bawah sinar UV 254 nm, berfluoresensi biru di bawah sinar UV 366 nm, dan memberikan warna hitam setelah disemprot dengan pereaksi FeCl₃ 5% (Yuda *et al.* 2017).

13.4 Saponin. Identifikasi secara KLT dilakukan dengan cara, fraksi teraktif daun stevia dan baku pembanding gliserisin ditotolkan pada fase diam silika gel GF₂₅₄, lalu dielusi dengan fase gerak kloroform-metanol-air perbandingan 6:3:1. Bercak diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, serta pereaksi Liebermann Burchard. Saponin memberikan warna biru, biru keunguan, atau merah setelah

disemprot dengan pereaksi Liebermann Burchard dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 menit (Minarno 2016).

13.5 Flavonoid. Identifikasi secara KLT dilakukan dengan cara, fraksi teraktif daun stevia dan baku pembanding rutin ditotolkan pada fase diam silika gel GF₂₅₄, lalu dielusi dengan fase gerak *n*-butanol-asam asetat-air perbandingan 4:1:5 (Feliana *et al.* 2018). Bercak diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, serta pereaksi semprot sitroborat. Flavonoid menunjukkan peredaman di bawah sinar UV 254 nm, berfluoresensi biru di bawah sinar UV 366 nm, dan memberikan warna kuning yang intens setelah disemprot dengan pereaksi sitroborat dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 menit (Rahayu *et al.* 2015).

14. Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi

Metode dilusi bertujuan untuk mengetahui nilai KHM dan KBM suatu antibakteri (Yanuhar 2016). Metode dilusi menggunakan deretan tabung yang terdiri dari 12 tabung reaksi. Pembuatan larutan stok fraksi etil asetat menggunakan pelarut yang sesuai. Tabung 2 sampai 11, masing-masing memiliki konsentrasi pengenceran yang berbeda yaitu 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,390; 0,195 dan 0,0975%.

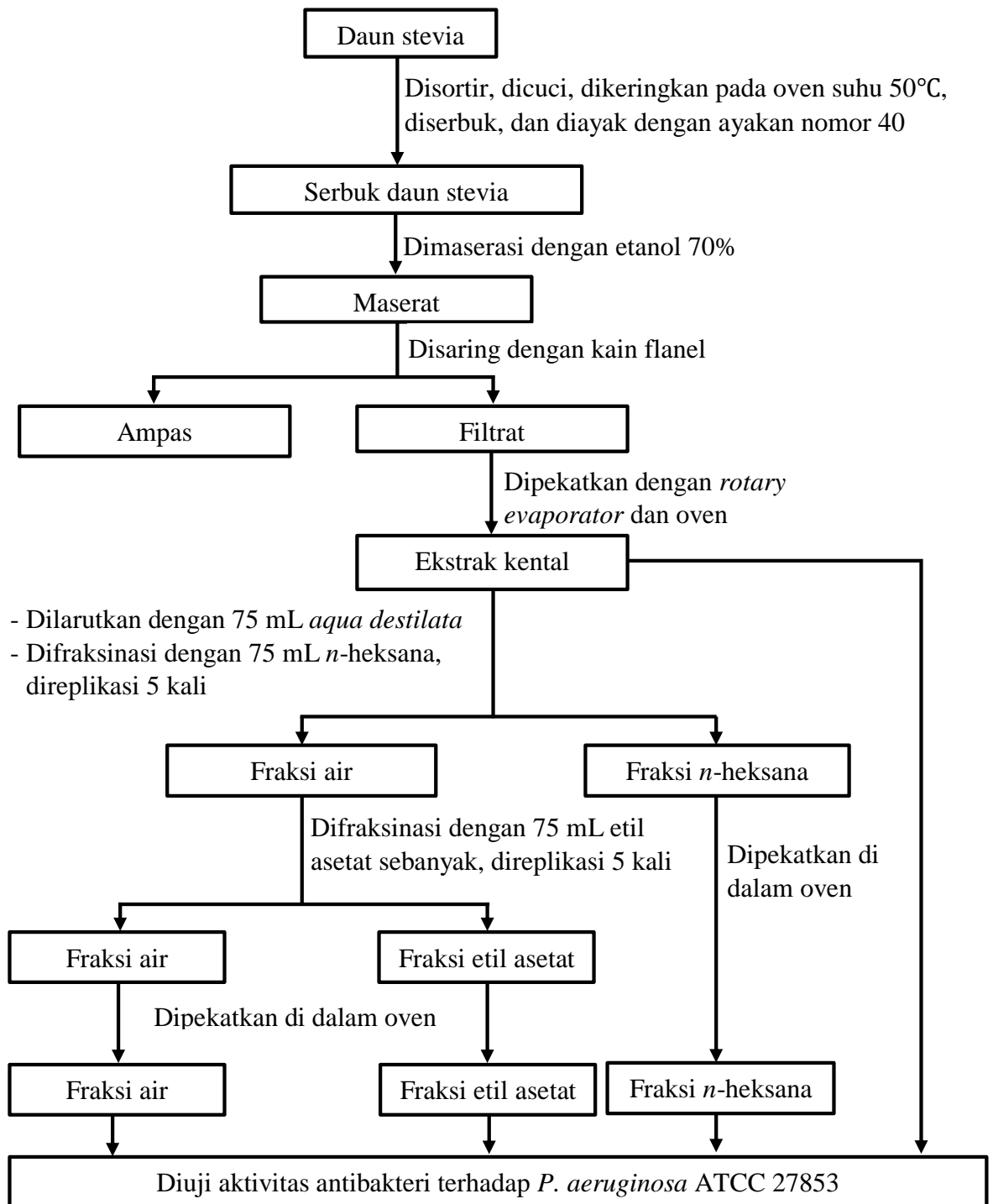
Langkah pertama, fraksi etil asetat dimasukkan ke dalam tabung 1 sebanyak 1 mL, tabung 2 sebanyak 0,5 mL, dan tabung 3 sebanyak 0,5 mL. Langkah kedua, tabung 3 sampai tabung 11 diisi dengan medium BHI sebanyak 0,5 mL. Langkah ketiga, tabung 3 divorteks kemudian diambil 0,5 mL untuk dipindahkan ke tabung 4. Tabung 4 divorteks, kemudian diambil 0,5 mL untuk dipindahkan ke tabung 5, dan seperti itu seterusnya sampai tabung 11. Tabung 11 setelah divorteks, isinya dibuang sebanyak 0,5 mL. Langkah keempat, suspensi bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 ditambahkan ke dalam tabung 2 sampai tabung 11 sebanyak 0,5 mL. Langkah kelima suspensi bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 dimasukkan ke dalam tabung 12 sebanyak 1 mL. Tabung 1 merupakan kontrol negatif, sedangkan tabung 12 merupakan kontrol positif. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, selanjutnya diamati isi tabung yang jernih untuk menentukan nilai KHM. Isi tabung yang jernih menunjukkan kandungan kimia di dalam fraksi etil asetat dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Fraksi etil asetat yang berwarna hitam pekat

menyebabkan tidak dapat diamatinya isi tabung yang jernih. Maka seluruh tabung diinokulasikan pada medium PSA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati medium yang tidak ditumbuhi bakteri. Medium yang tidak ditumbuhi bakteri pada pengenceran konsentrasi terendah dari fraksi etil asetat ditentukan sebagai nilai KBM. Pengujian dilakukan secara aseptis dan direplikasi sebanyak 3 kali.

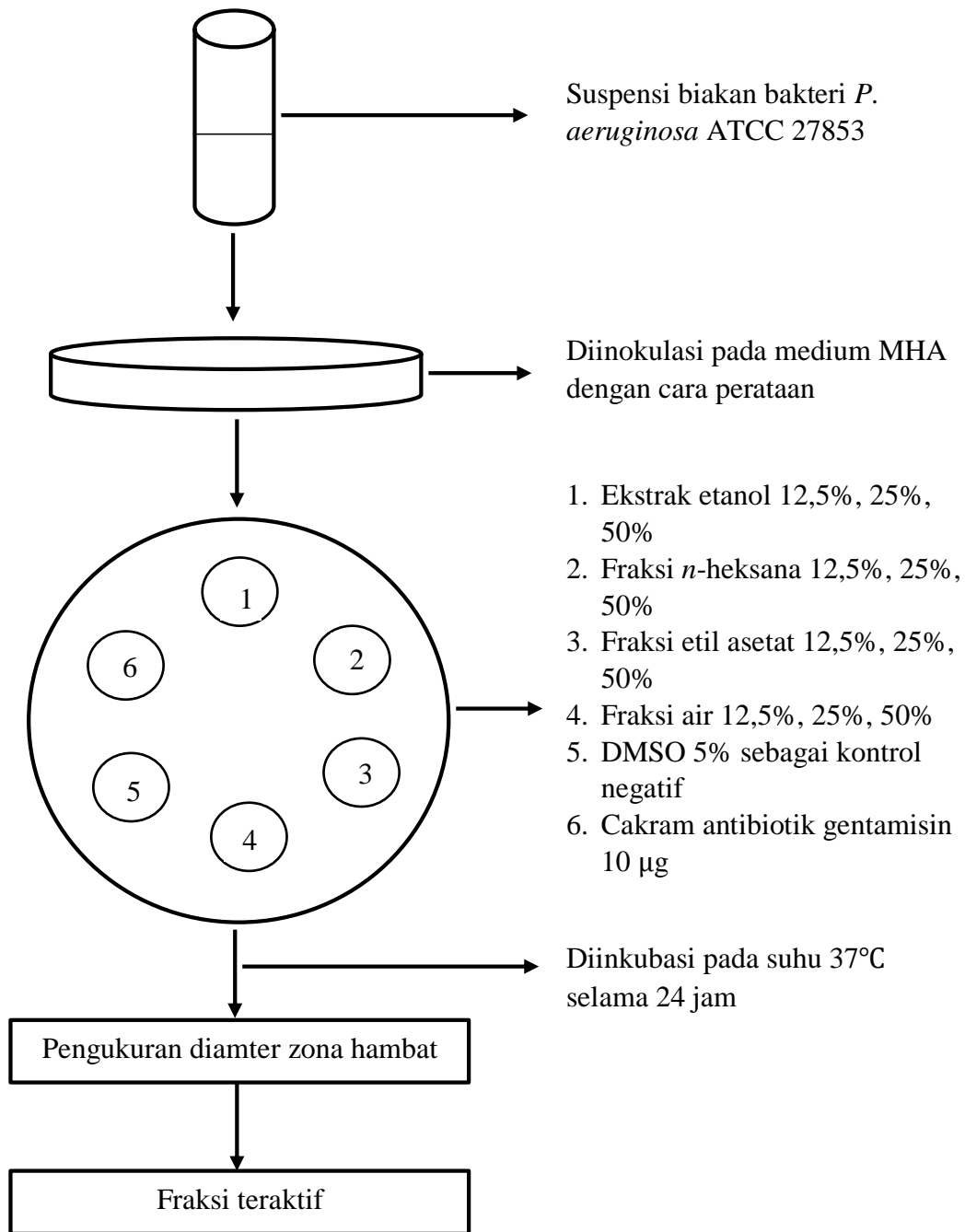
E. Analisis Data

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun stevia terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan metode difusi dinyatakan dengan nilai zona hambat. Data yang diperoleh dianalisa menggunakan *Kolmogorof-Smirnof*, jika terdistribusi normal dan homogen dapat dilanjutkan dengan analisa menggunakan metode statistik *One Way Anova*.

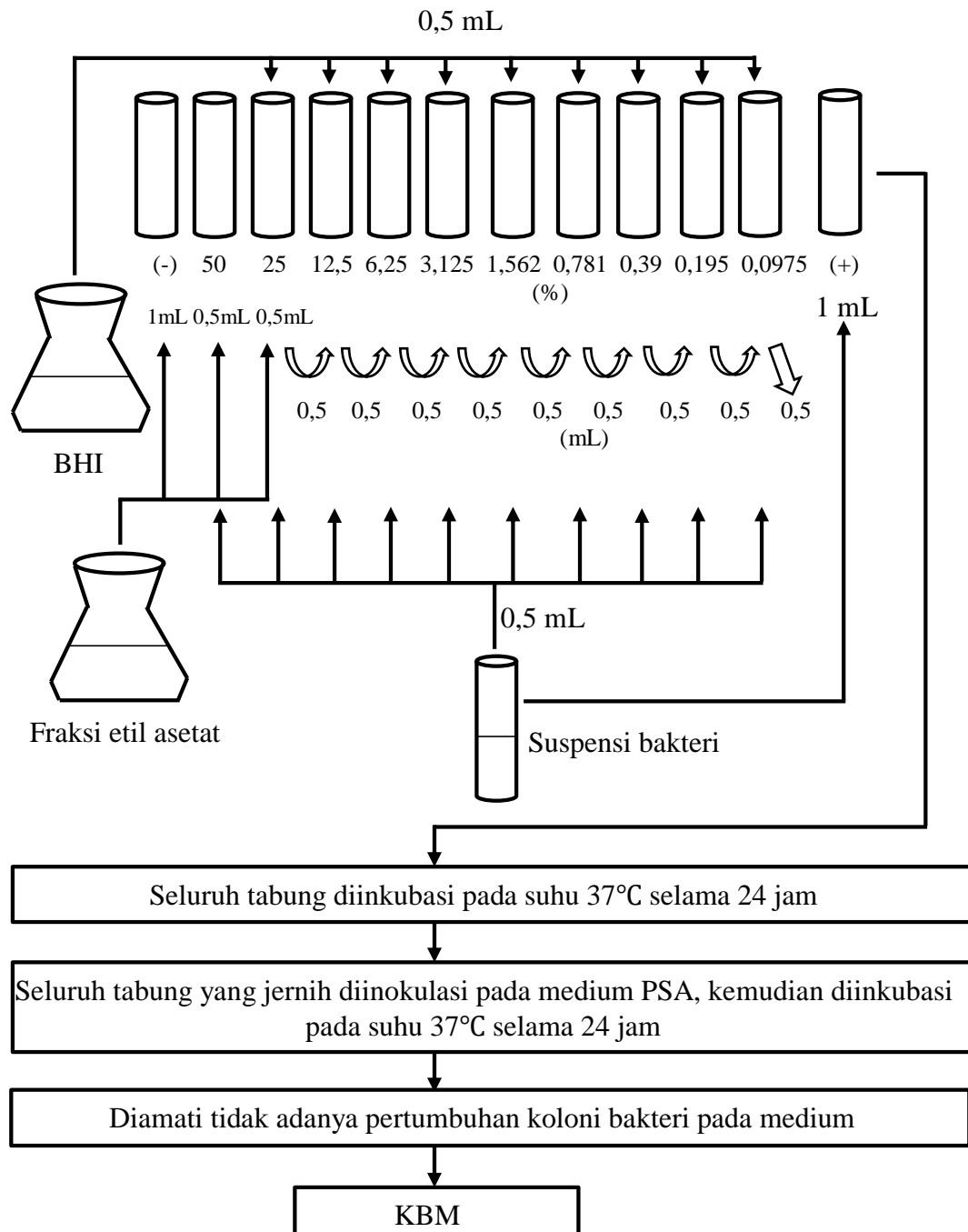
F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak dan fraksi daun stevia



Gambar 2. Skema uji aktivitas antibakteri daun stevia terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode difusi



Gambar 3. Skema uji aktivitas antibakteri daun stevia terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode dilusi