

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi merupakan semua obyek yang menjadi sasaran dalam sebuah penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman biduri (*Calotropis gigantea*) yang diperoleh dari daerah Mojosongo, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan adalah daun biduri (*Calotropis gigantea*) dengan spesifikasi daun berwarna hijau yang masih segar dan tidak terinfeksi hama. Pengambilan sampel diambil di daerah Mojosongo, Kota Surakarta, Jawa Tengah yang diambil pada bulan Januari 2019.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dari penelitian ini adalah uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-Heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak daun biduri (*Calotropis gigantea*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

##### **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 biasa diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi dari fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak daun biduri.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak daun biduri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dimedia uji.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922, lingkungan laboratorium (meliputi kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, waktu panen, pemilihan daun, metode ekstraksi dan fraksinasi.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun biduri adalah daun dari tanaman biduri yang segar, sehat dan terbebas dari hama dan penyakit yang tumbuh di daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah yang diambil pada bulan Januari 2019.

Kedua, daun biduri adalah daun dengan spesifikasi berwarna hijau muda dan helaian daun berbentuk bulat telur atau bulat panjang.

Ketiga, serbuk daun biduri adalah daun biduri yang sudah dipetik kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, setelah itu daun dikeringkan dengan oven pada suhu 45°C, kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Keempat, ekstrak daun biduri adalah hasil ekstraksi dengan larutan penyari etanol 96% menggunakan metode maserasi. Hasil maserasi kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai bebas etanol.

Kelima, fraksi daun biduri adalah fraksi dari daun biduri yang diperoleh dari proses fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air.

Keenam, fraksi *n*-heksana adalah fraksi dari ekstrak etanol dari daun biduri yang di fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut nonpolar, kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi *n*-heksana.

Ketujuh, fraksi etil asetat adalah fraksinasi dari air residu fraksi *n*-heksana dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semipolar, kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi etil asetat.

Kedelapan, fraksi air adalah fraksinasi dari residu etil asetat dengan menggunakan air sebagai pelarut polar, kemudian dipekatkan dengan *waterbath*.

Kesembilan, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah biakan murni bakteri gram positif, digunakan sebagai bakteri uji yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kesepuluh, bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah biakan murni bakteri gram negatif, digunakan sebagai bakteri uji yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kesebelas, uji aktivitas antibakteri secara difusi adalah uji dengan menggunakan seri konsentrasi 12,5%; 25% dan 50%, aktivitas antibakteri dengan melihat diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dalam media uji, kontrol positif adalah antibiotik siprofloksasin dan kontrol negatif adalah larutan DMSO 5%.

Keduabelas, uji aktivitas antibakteri secara dilusi adalah uji yang bertujuan untuk mengukur Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM), kontrol positif menggunakan suspensi bakteri dan kontrol negatif menggunakan fraksi teraktif.

### C. Bahan dan Alat

#### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah inkubator, *rotary evaporator*, destilasi uap-air, erlenmeyer, *waterbath*, jarum ose, *moisture balance*, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, cawan petri steril, kapas lidi steril, *obyek glass*, bejana maserasi, kertas cakram ukuran 6 mm, mikropipet, autovortex mixer, spidol, penggaris, gelas ukur, pipet volume, botol vial, autoklaf, pinset, oven dan neraca analitik.

#### 2. Bahan

**2.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan adalah daun biduri.

**2.2 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-Heksana, etil asetat, air, larutan mayer, larutan dragendorf, hidrogen peroksida, etanol 96%, DMSO 5%, serbuk magnesium, asam klorida pekat, asam asetat pekat, asam sulfat pekat dan kalium telurit 1%.

**2.3 Bakteri uji.** Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

**2.4 Medium.** Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Nutrient Agar* (NA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Endo Agar* (EA), *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Muller Hinton Agar* (MHA), SIM, KIA, LIA dan Citrat.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil agar menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Dalam penelitian ini sampel yang akan digunakan adalah daun biduri yang akandilakukandi Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

### **2. Pengambilan bahan**

Tanaman biduri diambil di daerah Mojosongo, Kota Surakarta, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan adalah daun pada tanaman biduri.

### **3. Pengeringan bahan**

Pembuatan ekstrak diawali dengan daun biduri yang telah dipilih kemudian dicuci dengan air untuk dibersihkan dari kotoran yang menempel. Daun biduri yang sudah bersih, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 45°C sampai didapatkan daun dengan kadar tertentu (Voight 1994).

### **4. Pembuatan serbuk simplisia**

Daun biduri yang sudah kering diserbuk dengan blender, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 agar didapatkan serbuk daun biduri dengan derajat kehalusan yang homogeny (Voight 1994).

### **5. Penentuan susut pengeringan serbuk daun biduri**

Susut pengeringan daun biduri dilakukan dengan cara serbuk daun biduri ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian diukur susut pengeringan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Suhu yang digunakan adalah 105°C, ditunggu hingga bobot akhir konstan atau biasanya selama 10 menit alat otomatis

akan berhenti bekerja sampai muncul angka dalam satuan %. Kadar air memenuhi syarat jika kadar air serbuk tersebut tidak lebih dari 10% (Voight 1994).

## **6. Pembuatan ekstrak etanol**

Ekstraksi serbuk daun biduri dilakukan dengan metode maserasi, serbuk daun biduri dimaserasi selama 5 hari dengan sesekali penggojokan berulang-ulang. Penggojokan dilakukan agar larutan yang konsentrasinya tinggi terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Setelah 5 hari, maserat disaring dengan menggunakan kain flanel kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Hasil maserasi diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 55°C sampai diperoleh ekstrak kental (Kemenkes RI 2013).

## **7. Uji bebas etanol**

Uji bebas alkohol ekstrak etanol daun biduri dilakukan dengan cara ekstrak daun biduri ditambah asam asetat encer dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Bila tidak timbul bau ester (etil asetat) artinya sudah bebas dari etanol (Praeparandi 2006).

## **8. Fraksinasi**

Ekstrak daun biduri ditimbang sebanyak 10 gram kemudian dilarutkan dengan air sebanyak 75 ml sampai terdispersi secara sempurna. Fraksinasi dilakukan menggunakan corong pisah dengan menambahkan pelarut *n*-heksana 75 ml, fraksi *n*-heksana (bagian atas) dipisahkan dengan fraksi air (bagian bawah). Fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan pelarut *n*-heksan. Fraksi *n*-heksan yang didapat dipekatkan menggunakan *waterbath* kemudian ditimbang.

Sisa dari *n*-heksana dilakukan fraksinasi sebanyak 3 kali dengan pelarut etil asetat 75 ml dalam corong pisah. Fraksi air dipisahkan dengan fraksi etil asetat dilakukan sebanyak 3 kali dengan penambahan pelarut. Fraksi etil asetat yang didapat dipekatkan menggunakan *waterbath* kemudian ditimbang.

Sisa dari etil asetat adalah fraksi air. Filtrat yang telah diperoleh kemudian dipekatkan dengan *waterbath* sampai kental lalu ditimbang.

## 9. Identifikasi kandungan senyawa kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam daun biduri. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa golongan flavonoid, tannin dan saponin.

**9.1 Identifikasi flavonoid.** Ekstrak etanol daun biduri dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 mL aquadest selama satu menit. Kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium dan ditambahkan 2 mL larutan alkohol 96% : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran larutan digojog kemudian didiamkan sampai memisah. Reaksi positif ditandai dengan timbulnya warna kuning atau merah pada lapisan amil alkohol (Sarker 2006).

**9.2 Identifikasi tanin.** Ekstrak etanol daun biduri dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 10 mL air panas kemudian dididihkan selama 15 menit dan saring. Filtrat yang diperoleh disebut larutan B. Sebanyak 5 mL larutan B ditambah pereaksi besi (III) klorida 1%. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna biru kehitaman (Depkes 1995).

**9.3 Identifikasi saponin.** Larutan uji hasil ekstraksi dididihkan dalam penangas air selama 5 menit, setelah dingin kemudian disaring, filtrat dikocok kuat-kuat dengan arah vertikal selama 1-2 menit, senyawa saponin dapat ditunjukkan dengan adanya busa setinggi 1cm yang stabil setelah dibiarkan selama 1 jam atau pada penambahan 1 tetes HCl 0,1N (Depkes 1989).

## 10. Sterilisasi alat

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada tekanan 1,5 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Cawan petri dan tabung reaksi disterilkan dengan oven pada suhu 170°-180°C selama 2 jam. Sterilisasi inkas menggunakan formalin dan jarum Ose disterilkan menggunakan pemanas api langsung (Suriawiria 2005).

## 11. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi diawali dengan mengambil sebanyak 2-3 Ose biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 yang masing-masing disuspensikan pada 5 ml media *Brain Heart Infusion* (BHI), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Tabung yang

sudah diinkubasi kekeruhannya disesuaikan dengan standar Mc.Farland 0,5 mempunyai populasi ( $1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Pada uji dilusi pembuatan suspensi yang didapatkan, diencerkan dengan perbandingan 1:1000 yaitu dengan mengambil 0,1 ml suspensi bakteri dimasukkan pada media BHI sebanyak 100 ml.

## **12. Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

**12.1 Identifikasi koloni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.** Suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasikan pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang sudah ditambahkan kalium tellurite 1% sebanyak 3 tetes dalam cawan petri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditandai dengan warna koloni hitam dan warna media di sekitar koloni kuning. Warna tersebut timbul disebabkan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mampu memfermentasi manitol menjadi asam dan mereduksi kalium tellurite disekitar koloni menjadi hitam, dengan adanya indikator *fenol red* menyebabkan warna pada media di sekitar koloni menjadi kuning (Jawetz *et al.* 2007).

**12.2 Identifikasi mikroskopis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan pewarnaan Gram.** Pewarnaan gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan Gram A (Kristal Violet) sebagai cat utama, Gram B (Lugol Iodine) sebagai mordan, Gram C (etanol:aseton 1;1) sebagai peluntur dan Gram D (cat safranin) sebagai cat penutup. Pewarnaan dimulai dengan cara dibuat preparat ulas (*smear*) yang sudah difiksasi kemudian ditetesi Gram A sampai ulasan rata terwarnai, diamkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir kemudian ditetesi Gram B, didiamkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir kemudian ditetesi Gram D dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir kemudian preparat dikeringkan. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop. Hasil positif dinyatakan dengan bakteri berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur.

**12.3 Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan uji biokimia.** Pada uji katalase digunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada media cair dengan penambahan 2 tetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> digunakan dalam pengujian ini karena merupakan salah satu hasil respirasi aerobik bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri karena bersifat toksik bagi bakteri itu sendiri sehingga komponen ini dipecah agar tidak bersifat toksik lagi. Penambahan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> akan terurai menjadi air dan oksigen, hasil dinyatakan positif apabila terlihat pembentukan gelembung udara di sekitar koloni, hal ini disebabkan karena bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mempunyai enzim katalase yang mampu memecah hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air (Jawetz *et al.* 2012). Uji koagulase dibuat dengan cara menyiapkan plasma kelinci dan asam sitrat encer 1:5 ditambah 1 ose biakan bakteri dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-4 jam. Hasil positif akan ditunjukkan dengan terjadinya penggumpalan pada tabung reaksi, dan apabila dibalik gumpalan plasma akan tetap melekat pada dinding tabung reaksi (Radji 2011).

### **13. Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922**

**13.1 Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 secara makroskopis.** Identifikasi dilakukan dengan cara biakan *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasi pada media selektif EA (Endo Agar) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasilnya koloni akan tampak berwarna merah seperti kilap logam. Warna koloni merah disebabkan karena *Escherichia coli* dan koliform memetabolisme laktosa menjadi aldehid sehingga bereaksi dengan fuchsin dengan melepaskan fuchsin dari senyawa fuchsin-sulfat (Kartika *et al.* 2014).

**13.2 Identifikasi mikroskopis bakteri uji dengan pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram dilakukan dengan menggunakan Gram A (Kristal Violet) sebagai cat utama, Gram B (Lugol Iodine) sebagai mordan, Gram C (etanol:aseton 1:1) sebagai peluntur dan Gram D (cat safranin) sebagai cat penutup. Pewarnaan dimulai dengan cara dibuat preparat ulas (*smear*) yang sudah difiksasi kemudian ditetesi Gram A sampai ulasan rata terwarnai, didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir kemudian ditetesi Gram B, didiamkan selama 1 menit



kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir kemudian ditetesi Gram D dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir kemudian preparat dikeringkan. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop, bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dinyatakan positif apabila tampak warna bakteri merah dan berbentuk batang lurus.

### **13.3 Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan uji biokimia.**

Identifikasi uji biokimia dilakukan dengan media SIM, KIA, LIA dan Sitrat.

**13.3.1 Media SIM (*Sulfida Indol Motility*).** Biakan murni diinokulasi pada media dengan tusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji sulfida dikatakan positif apabila media berwarna hitam. Uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah reagen Ehrlich A dan B. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri. Hasil positif dituliskan dengan tanda (-++).

**13.3.2 Media KIA (*Kliger's Iron Agar*).** Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan pada bagian lereng dan dasar untuk melihat ada tidaknya gas dan terbentuknya warna hitam pada media. Pada bagian miring, jika bakteri dapat memfermentasi laktosa dan glukosa maka warna media berubah menjadi kuning. Hasil positif dapat dituliskan A/AS-.

**13.3.3 Media LIA (*Lysin Iron Agar*).** Metode ini bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba penghasil enzim yang mampu mendekarboksilasi asam amino lisin dan memproduksi gas H<sub>2</sub>S. Pengujian ini dilakukan dengan cara biakan bakteri diinokulasi secara tusukan dan goresan, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan pada bagian lereng media apabila berwarna merah ditulis (R), berwarna kuning ditulis (A) berarti menunjukkan suasana asam, berwarna ungu ditulis (K) karena bakteri tidak memecah lisin, serta timbulnya warna hitam pada media ditulis (S<sup>+</sup>). Hasil positif ditulis K/KS-.

**13.3.4 Media Sitrat.** Media sitrat merupakan media yang digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri memetabolisme sitrat sebagai sumber karbohidrat. Pengujian dilakukan dengan cara biakan murni diinokulasi pada media secara goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Indikator yang digunakan yaitu *Bromothymol blue*. Hasil uji akan dinyatakan positif apabila timbul warna hijau dalam media (-).

#### **14. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dan dilusi**

**14.1 Uji aktivitas antibakteri secara difusi.** Metode difusi yang digunakan adalah metode difusi cakram (*disc*). Metode ini menggunakan cakram kertas saring yang berfungsi sebagai tempat menampung zat antimikroba. Zat antimikroba yang akan diuji dibuat masing-masing konsentrasi ekstrak dan fraksi yaitu 50%; 25%; 12,5% dengan kontrol positif (siprofloksasin) dan kontrol negatif (DMSO). Kertas cakram tersebut kemudian diletakkan pada cawan petri yang telah dituangkan media MHA dan sudah diinokulasi dengan bakteri uji. Kemudian cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, kemudian lakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat, untuk replikasi dilakukan sebanyak tiga kali. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram menandakan bahwa kandungan kimia daun biduri memiliki daya hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Fraksi teraktif yang dihasilkan kemudian diuji dengan metode dilusi.

**14.2 Uji aktivitas antibakteri secara dilusi.** Metode dilusi dilakukan dengan menyiapkan 12 tabung steril dengan dua diantaranya digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif, sisanya digunakan untuk seri pengenceran larutan uji. Secara aseptis dari larutan uji dibuat seri konsentrasi yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%. Suspensi bakteri dalam medium BHI (*Brain Heart Infusion*) dimasukkan kedalam masing-masing tabung reaksi uji kecuali tabung pertama (kontrol negatif). Kontrol negatif berisi 1 mL bahan uji dan kontrol positif berisi 1 mL suspensi bakteri, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati kekeruhannya. Menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu batas terendah tabung media yang jernih atau yang menunjukkan hasil negatif, fraksi teraktif yaitu ditunjukkan dengan tidak ada koloni

bakteri yang tumbuh pada media MHA, kemudian untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan cara tabung yang jernih diinokulasikan secara goresan pada media selektif untuk masing-masing bakteri uji, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dan diamati ada atau tidaknya koloni berwarna hitam pada media. Skema penelitian dapat dilihat pada gambar 7 dan 8.

### **15. Identifikasi golongan senyawa pada fraksi teraktif secara Kromatografi Lapis Tipis**

Identifikasi dilakukan dengan cara fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun biduri dilarutkan, kemudian sentuhkan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari sisi bagian bawah lempeng KLT. Chamber dilapisi dengan kertas saring dan dijenuhkan dengan fase gerak yang sesuai hingga kertas saring terbasahi semuanya. Selanjutnya setelah kering, lempeng KLT dimasukkan ke dalam chamber yang sudah dijenuhkan, elusi dilakukan sampai jarak tertentu. Lempeng KLT diangkat dan diangin-anginkan hingga kering, selanjutnya deteksi noda di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Bercak yang terdeteksi kemudian ditentukan nilai Rf dan kenampakan warna yang timbul.

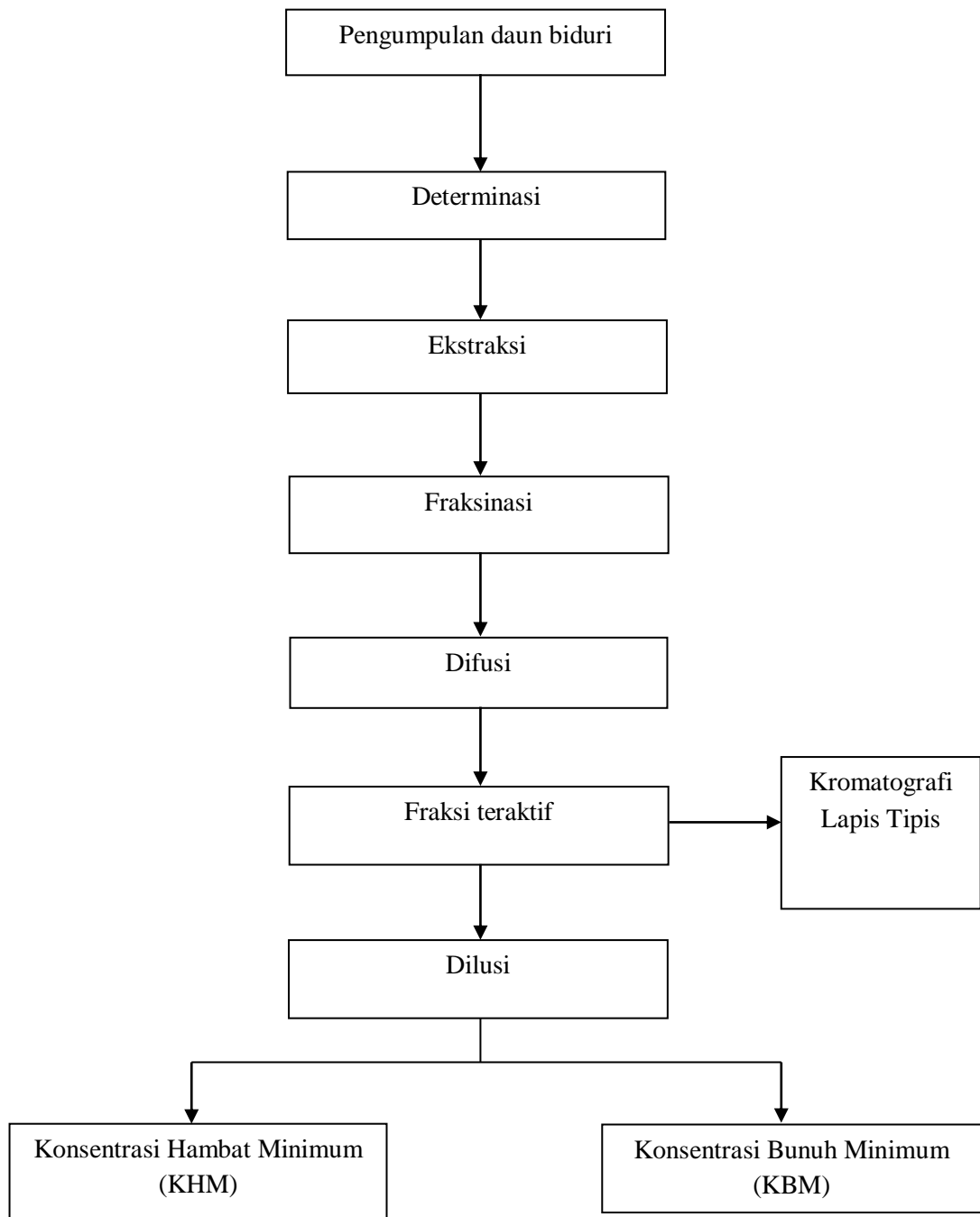
**15.1 Identifikasi flavonoid.** Identifikasi ini menggunakan fase gerak butanol : asam asetat glasial: air (4:1:5) dan fase diam silika gel GF 254 nm (Haeria 2013), dengan pereaksi penampak sitroborat. Flavonoid akan berflouresensi pada sinar UV 366 nm. Hasil positif ditunjukkan apabila terbentuk flouresensi kuning, biru dan ungu pada UV 366 nm.

**15.2 Identifikasi tanin.** Identifikasi senyawa tanin menggunakan fase diam silika gel GF 254 nm dan fase geraknya menggunakan *n*-Heksana:etil asetat (6:4). Pereaksi semprot yang digunakan FeCl<sub>3</sub> 1% kemudian dideteksi di bawah sinar UV 366 nm berwarna hitam (Harborne 1987).

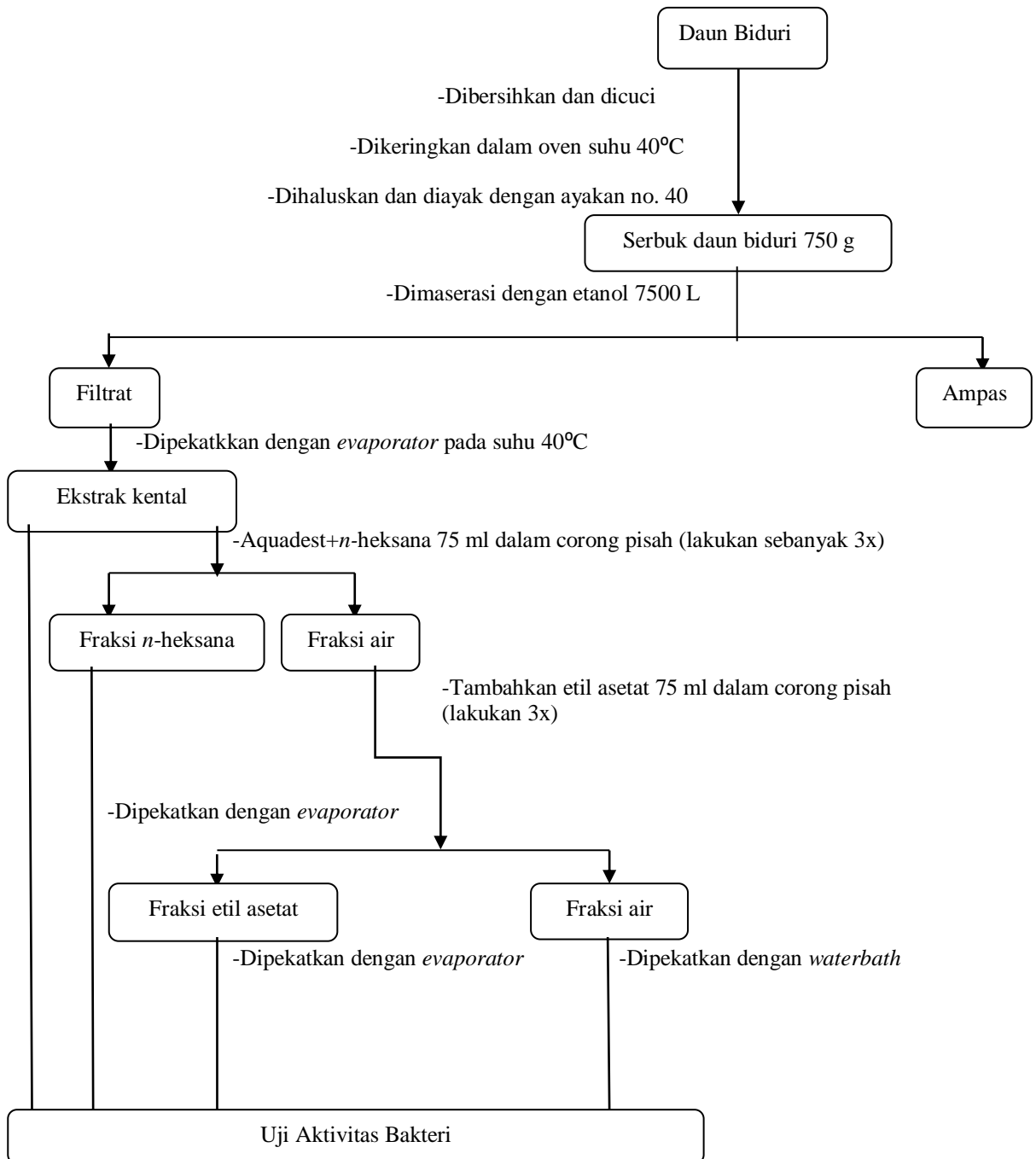
**15.3 Identifikasi saponin.** Identifikasi dilakukan dengan cara fase diam silika gel GF 254 dan fase geraknya heksana:aseton (4:1), kemudian dideteksi dibawah sinar UV 366 nm, hasil positif akan menunjukkan warna kuning. Pereaksi semprot menggunakan anisaldehyd dengan hasil berwarna merah jambu sampai ungu (Marliana *et al.* 2005).

### **E. Analisis Data**

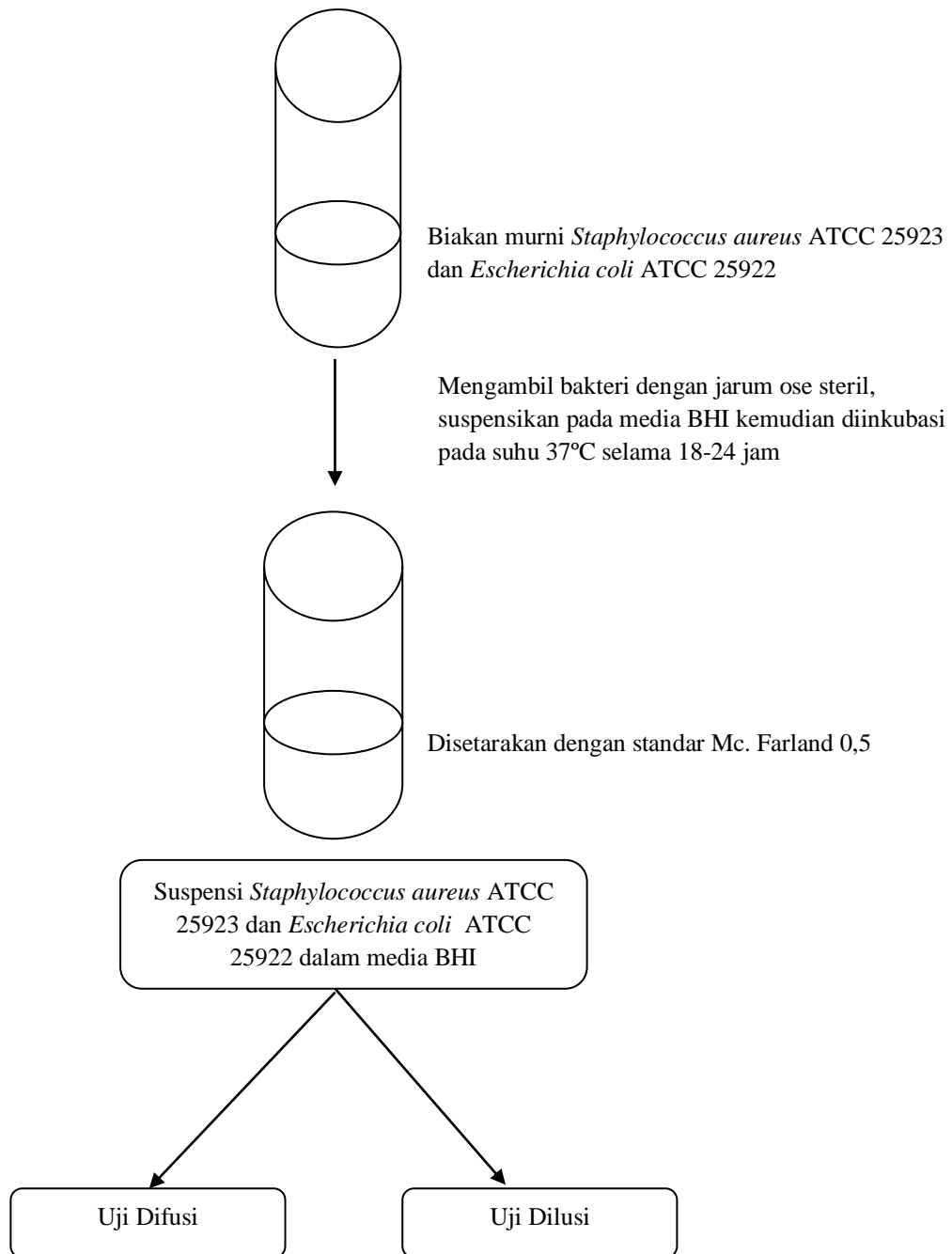
Data yang diperoleh dari metode pengujian aktivitas antibakteri berupa nilai besarnya zona hambat atau zona bening dari konsentrasi ekstrak dan fraksi daun biduri dalam satuan milimeter. Besarnya nilai zona hambat atau zona bening yang dihasilkan dari ekstrak dan fraksi daun biduri dianalisis dengan metode Kolmogorov-Smirnov. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dilanjutkan dengan *two way analysis of variant* (ANOVA) dua jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Lanjutkan dengan uji Tukey untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya.



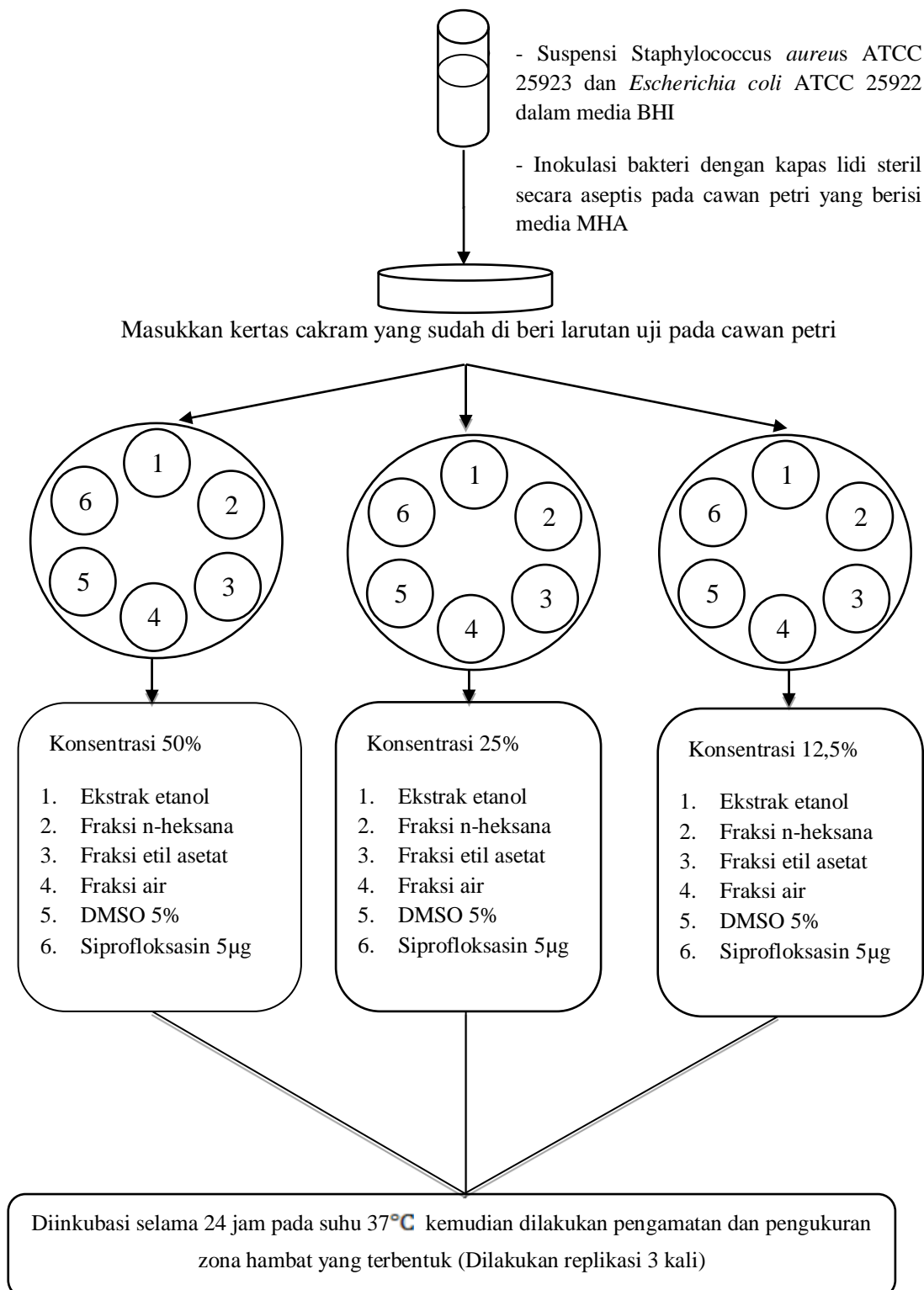
**Gambar 4. Skema penelitian secara menyeluruh.**



**Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak dan fraksi daun biduri (*Calotropis gigantea*).**

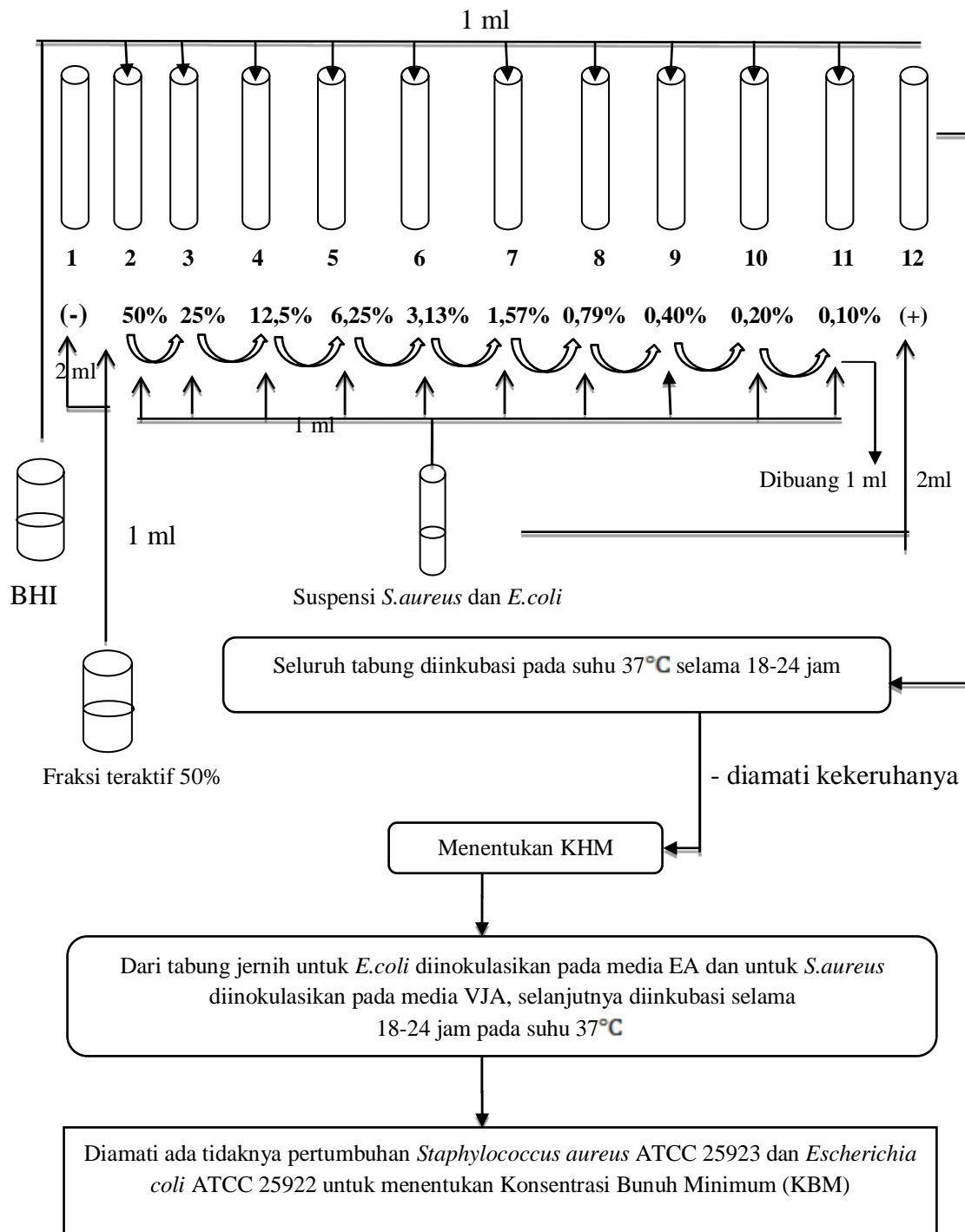


**Gambar 6.** Skema pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.



**Gambar 7. Skema pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.**





**Gambar 8. Skema pengujian antibakteri dengan metode dilusi terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.**