

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun wangon (*Olax scandens* Roxb.) yang diambil secara acak pada bulan Januari 2019 dari Desa Bantengan, Kecamatan Jati, Kabupaten Blora, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun wangon yang diambil secara acak. Daun wangon (*Olax scandens* Roxb.) dipilih yang masih segar, tidak ada kotoran, tidak busuk, bebas dari hama, dan daunnya belum berubah warna yang dipetik pada pagi hari di Desa Bantengan, Kecamatan Jati, Kabupaten Blora, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah aktivitas antibakteri, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun wangon (*Olax scandens* Roxb.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi dan dilusi.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel kendali adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun wangon dengan berbagai konsentrasi.

2.2 Variabel kendali. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel tergantung seperti uji kemurnian bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, kondisi laboratorium (antara lain kondisi inkas, alat, dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, tempat tumbuh tanaman, waktu panen dan metode ekstraksi.

2.3 Variabel tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun wangon (*Olox scandens* Roxb.) yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media uji.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun wangon (*Olox scandens* Roxb.) adalah daun yang diambil dari Desa Bantengan, Kecamatan Jati, Kabupaten Blora, Jawa Tengah dengan kondisi yang masih segar dan warna belum berubah.

Kedua, serbuk daun wangon (*Olox scandens* Roxb.) adalah daun wangon yang diambil dan dicuci guna untuk membersihkan kotoran yang masih menempel setelah itu dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 50°C sampai kering, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan mesh nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun wangon adalah hasil ekstraksi serbuk daun wangon dengan cara metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang kemudian dipekatkan dengan *vaccum rotary evaporator*.

Keempat, fraksi *n*-heksana daun wangon adalah hasil fraksinasi dari ekstrak etanol daun wangon dengan menggunakan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut nonpolar.

Kelima, fraksi etil asetat daun wangon adalah hasil fraksinasi dari residu *n*-heksana dengan menggunakan pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar.

Keenam, fraksi air daun wangon adalah hasil fraksinasi dari residu fraksi etil asetat dengan menggunakan air sebagai pelarut polar.

Ketujuh, adalah bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteria adalah dengan menggunakan metode difusi untuk mengukur luas daerah hambatan yaitu daya hambat yang menghambat pertumbuhan bakteri dengan menggunakan berbagai konsentrasi yaitu 5%, 10%, 20%, 40% dengan kontrol positif (+) menggunakan antibiotik kotrimoksazol 25 μ g/disk dan kontrol negatif (-) dengan menggunakan DMSO 5%.

Kesembilan, uji aktivitas antibakteri adalah dengan menggunakan metode dilusi. Metode dilusi adalah metode uji aktivitas antibakteri dengan membuat satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,156%, 0,078% dengan kontrol positif (+) menggunakan suspensi bakteri dan kontrol negatif (-) adalah daun wangen dari fraksi etil asetat yang paling efektif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat maserasi berupa botol mulut lebar berwarna coklat, ose tangkai panjang, rak tabung, tabung reaksi, mikropipet, dandang besar, inkubator, pinset, vial, spuit, *deglass*, *beaker glass*, oven, selang, corong penyaring, kain flanel, labu alas bulat, lampu spiritus, tabung reaksi, cawan petri steril, kertas cakram, zona meter, alat penggiling, ayakan nomor 40, timbangan analitik, erlenmeyer, *moisture balance*, batang pengaduk, inkas, kaca objek, mikroskop, pipet ukur, corong pisah, kapas lidi steril, blender untuk membuat serbuk, alat maserasi, *vaccum rotary evaporator*, gelas ukur, inkas, kaki tiga, dan kertas saring.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah serbuk kering daun wangen yang diperoleh dengan ciri-ciri tidak busuk, tidak berubah warna, bebas dari hama dan bersih dari kotoran.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96%, *n*-heksana, etil asetat, aquadestilata, DMSO 5%, reagen mayer, reagen dragendrof, serbuk Mg, FeCl₃, safranin, alkohol, kristal violet, larutan mordant.

2.3 Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2.4 Media. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah NaCl, BHI, *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfida Indol Media* (SIM), *Kliglers Iron Agar* (KIA), *Lysin Iron Agar* (LIA), *Simmon Citrat*, *Endo Agar* (EA).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian adalah dengan melakukan determinasi tanaman daun wangon yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi daun wangon yang dibuktikan di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta. Adapun tujuan lain determinasi adalah untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan bahan serta menghindari tercampurnya dengan tanaman lain.

2. Pengambilan bahan

Daun wangon diperoleh dari Desa Bantengan, Kecamatan Jati, Kabupaten Blora, Jawa Tengah yang diambil pada bulan Januari sebanyak 6 kg. Daun wangon yang digunakan dengan ciri-ciri tidak busuk, segar, berwarna hijau, bebas dari hama, dan bersih. Sebelumnya daun dicuci dan dibersihkan terlebih dahulu.

3. Pengeringan dan pembuatan serbuk daun wangon

Daun wangon yang sudah dibersihkan dengan air yang mengalir sampai terbebas dari kotoran debu. Daun wangon yang sudah bersih kemudian dipotong-potong lalu ditimbang, setelah itu dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C sampai menjadi kering. Daun wangon yang telah kering diserbuk dengan alat penggiling kemudian diayak dengan ayakan mesh nomor 40 sehingga diperoleh serbuk daun wangon yang mempunyai derajat kehalusan yang relatif homogen. Penyerbukan bertujuan agar luas partikel bahan yang kontak dengan pelarut dapat diperluas sampai penyarian berlangsung secara efektif.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun wangon

Sebanyak 1000 gram serbuk daun wangon dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 7500 ml di dalam botol kaca gelap, kemudian didiamkan selama 5 hari dan digojok 8 jam sekali. Maserasi yang telah didiamkan selama 5 hari disaring dengan kain flanel steril, kemudian ampas dibilas sampai diperoleh 100 bagian atau dengan penambahan sisa pelarut sebanyak 2500 ml hingga diperoleh filtrat 10000 ml. Hasil ekstraksi digabungkan, kemudian dipekatkan dengan menggunakan *evaporator* pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental.

5. Uji bebas etanol ekstrak daun wangon

Uji esterifikasi dilakukan dengan cara ekstrak ditambah dengan H₂SO₄ pekat dan CH₃COOH 1%. Uji positif ekstrak bebas etanol jika tidak terdapat bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 2006).

6. Parameter serbuk dan ekstrak

6.1 Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak. Penetapan kandungan lembab serbuk dan ekstrak daun wangon pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Penetapan kandungan lembab dilakukan dengan cara ditimbang 2 gram, lalu diukur kadar lembab dari serbuk dan juga ekstrak dengan menggunakan alat *moisture balance* yang telah diatur suhunya sebesar 105°C. Selanjutnya *moisture balance* ditutup dan ditunggu sampai terdengar bunyi pada alat sebagai tanda, kemudian mencatat angka yang muncul dalam satuan persen pada alat *moisture balance* sebagai kelembaban. Penetapan dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

6.2 Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak. Penetapan kadar air menggunakan alat *Sterling-Bidwell* dengan cara menimbang serbuk sebanyak 5 gram. Serbuk atau ekstrak dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xilen kurang lebih 200 ml sampai serbuk terendam. Alat *Sterling-Bidwell* dipasang dan dipanaskan dengan menggunakan penangas air. Pemanasan dihentikan bila pada penampung tidak menetes lagi dan dilanjutkan dengan mengukur kadar air dengan melihat volume pada skala alat. Penetapan dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Kemenkes 2011).

6.3 Bobot jenis ekstrak. Piknometer ditimbang dengan volume tertentu dalam keadaan kosong. Selanjutnya piknometer diisi penuh dengan air dan ditimbang, sehingga kerapatan air dapat ditetapkan. Piknometer dikosongkan dan diisi penuh dengan ekstrak daun wangen, kemudian ditimbang sehingga kerapatan ekstrak daun wangen dapat ditetapkan. Bobot jenis dilakukan pada suhu kamar. Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak (5% dan 10%) dalam pelarut tertentu (etanol) dengan alat piknometer (Depkes RI 2000).

7. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang 10 gram ekstrak daun wangen kemudian dilarutkan dalam pelarut etanol 5 ml dan air 70 ml sampai terdispersi sempurna. Kemudian dilakukan fraksinasi sebanyak 3 kali dengan pelarut *n*-heksana 75 ml. Alat yang digunakan pada saat proses fraksinasi adalah corong pisah dimana fase *n*-heksana merupakan filtrat yang berada diatas dan fase air merupakan filtrat yang berada dibawah. Fraksi *n*-heksana yang didapat kemudian dipisahkan dari fraksi air dan dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C (Rahmawati *et al* 2015).

Fraksi air sisa dari fraksi *n*-heksana dilanjutkan fraksinasi kembali sebanyak 3 kali dengan pelarut etil asetat 75 ml menggunakan corong pisah. Fraksi etil asetat merupakan filtrat yang berada diatas dan fraksi air merupakan filtrat yang terletak dibawah. Fraksi etil asetat dipisahkan dari fraksi air kemudian ditampung dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air yang kemudian dikentalkan di *waterbath* (Rahmawati *et al* 2015).

8. Identifikasi kandungan kimia ekstrak dan serbuk daun wangen

Identifikasi kandungan kimia di maksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak daun wangen dan juga serbuk dari ekstrak daun wangen. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, dan steroid yang dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi Surakarta.

8.1 Identifikasi alkaloid. Ekstrak diambil sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan menggunakan HCl. Teteskan

dengan pereaksi dragendrof sebanyak 2-3 tetes. Hasil positif jika mengandung senyawa alkaloid maka terbentuk endapan berwarna merah. Bahan uji ditambahkan larutan mayer, apabila positif mengandung senyawa alkaloid akan terbentuk endapan berwarna kuning (Tiwari *et al* 2011).

8.2 Identifikasi flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menggunakan *Shinoda test* dengan cara ditimbang 2 ml bahan uji ditambahkan air panas secukupnya, kemudian dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat sebanyak 5 ml ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Pembentukan intensitas warna kuning, merah atau jingga menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Harborne 1996).

8.3 Identifikasi tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan menggunakan tes besi (III) klorida dengan cara 1 mL bahan uji dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah dengan beberapa tetes pereaksi FeCl_3 10%. Terbentuknya warna biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Jones *et al* 2006).

8.4 Identifikasi saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan menggunakan *foam test* dengan cara sebanyak 0,5 gram bahan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2 ml air, lalu dikocok kuat. Jika buih yang terbentuk bertahan selama 10 menit menunjukkan adanya saponin (Tiwari *et al* 2011).

8.5 Identifikasi steroid/triterpenoid. Identifikasi steroid dilakukan dengan cara 0,5 gram bahan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 0,5 ml kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 ml asetat anhidrat dan ditetesi dengan 2 ml H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung (pereaksi *Lieberman Bourchard*). Hasil positif akan terbentuk warna hijau untuk steroid (Setyowati *et al* 2004). Hasil positif triterpenoid akan terbentuk warna merah atau ungu (Septyaningsih 2010).

9. Uji aktivitas antibakteri

9.1 Sterilisasi. Sterilisasi merupakan suatu tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah dan kering, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar-X, sinar α (alfa), sinar γ (gamma) dan sinar

UV. Sterilisasi secara kimia yaitu dengan penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu dengan menggunakan saringan atau filter untuk bahan yang akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemanasan yang tinggi atau tekanan yang tinggi. Bahan atau pelarut yang digunakan dalam mikrobiologi harus dalam keadaan yang steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu atau merusak media dan yang mengganggu kehidupan dalam proses yang sedang dikerjakan (Suriawiria 2005).

Media yang akan digunakan disterilisasikan terlebih dahulu dengan cara dimasukkan ke dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan *beaker glass* disterilkan dengan cara dimasukkan ke dalam oven pada suhu 170°C-180°C selama 2 jam. Alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan menggunakan pemanasan api secara langsung. Sterilisasi inkas dilakukan dengan menggunakan formalin (Denyer *et al* 2004).

9.2 Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Identifikasi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, suspensi *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasi pada media *Endo Agar* (EA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif bila koloni yang nampak dengan warna kilat logam dan warna mediumnya merah violet (Volk & Wheeler 1988).

9.3 Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut Gram negatif atau Gram positif. Gram negatif didapatkan bila sel berwarna merah, bentuk bacili berarti positif. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat ulasan (smear) yang difiksasi kemudian ditetesi kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, didiamkan ± selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan aquadest mengalir lalu ditetesi dengan larutan mordant (Gram B). Selanjutnya didiamkan ± selama 1 menit dan dicuci kembali dengan aquadest mengalir serta dianginkan. Preparat dilunturkan dengan menggunakan larutan alkohol (Gram C) hingga alkohol yang jatuh berwarna jernih, lalu dicuci dengan menggunakan aquadest yang mengalir. Preparat ditetesi larutan safranin (Gram D), kemudian ditunggu 45 detik dan dicuci dengan menggunakan aquadest yang

mengalir. Preparat kemudian dikeringkan dengan kertas tissue yang ditempelkan di sisi ulasan, lalu didiamkan sampai mengering di udara serta diamati di bawah mikroskop (Volk & Wheeler 1988).

9.4 Uji biokimia. Identifikasi berdasarkan uji biokimia dengan menggunakan media SIM, LIA, KIA dan Citrat.

9.4.1 Media SIM (*Sulfide Indol Motilitas*). Biakan murni diinokulasi pada permukaan media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida hasilnya positif, bila media berwarna hitam. Uji indol hasil positif, bila terbentuk warna merah setelah ditambah dengan reagen Erlich A dan B. Uji motilitas hasilnya positif, bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasi, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagella. Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan dengan sulfida negatif, indol positif, motiliti positif (-++) (Harti 2015).

9.4.2 Media KIA (*Kliger Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dan sulfida. Langkah selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar terdapat gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada bagian lereng akan berwarna kuning (ditulis A), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas ditandai dengan adanya pecahan gas pada media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+). Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan pada bagian lereng berwarna kuning, bagian dasar berwarna kuning, dan sulfida negatif atau tidak terbentuk warna hitam (A/AGS-).

9.4.3 Media LIA (*Lysine Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi tusukan dan goresan kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi bertujuan untuk menguji lisin dan sulfida. Langkah selanjutnya diamati bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji tersebut hasilnya positif, maka lereng akan membentuk warna coklat (ditulis R),

berwarna ungu (ditulis K), berwarna kuning (ditulis A), serta terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+). Hasil positif dari *Escherichia coli* ditunjukkan dengan K/KS⁻ (Harti 2015).

9.4.4 Media Citrat. Biakan bakteri diinokulasi goresan kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Bakteri yang memanfaatkan citrat sebagai sumber karbon akan menghasilkan natrium karbonat yang bersifat alkali, sehingga dengan adanya indikator *bromthymol blue* menyebabkan warna biru pada media. Uji tersebut hasilnya positif bila media berwarna biru dan negatif bila media berwarna tetap yaitu hijau. Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan dengan hasil sitrat yang negatif (Harti 2015).

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi dengan mengambil *Escherichia coli* biakan murni kurang lebih satu ose kemudian dipindahkan ke dalam tabung yang berisi media BHI lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 jam. Diperoleh suspensi bakteri dengan kekeruhan yang sama dengan standar Mc Farland 0,5 yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Jika kekeruhan belum sesuai dengan standar maka dilakukan pengenceran 1:1000, selanjutnya digunakan untuk identifikasi (Bonang & Koeswandoro 1982).

11. Pengujian aktivitas antibakteri daun wangon

11.1 Pengujian antibakteri secara difusi. Pengujian dengan menggunakan metode difusi ini digunakan untuk mengetahui fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun wangon dan untuk mengetahui daya hambat pertumbuhan dari biakan bakteri uji dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 40%, 20%, 10% dan 5%. Metode difusi dapat dilakukan dengan cara suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang sudah disetarakan dengan standar Mc Farland 0,5 dioleskan secara merata pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dengan menggunakan kapas lidi yang steril dengan metode perataan. Didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke media. Masing-masing kertas cakram (*blank disc*) dengan diameter 6 mm diisi dengan ekstrak etanol daun

wangon, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, kontrol negatif DMSO 5% dan kontrol positif kotrimoksazol 25 µg diletakkan di atas media selama 15 menit (Ismail 2014). Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Langkah selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil diamati dan diukur diameter daya hambat yang terlihat di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong yang memiliki satuan milimeter (mm). Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar cakram menandakan bahwa kandungan kimia yang terdapat pada daun wangon memiliki daya hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

11.2 Pengujian antibakteri secara dilusi. Metode dilusi digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif. Metode dilusi menggunakan 1 deret tabung reaksi yang berjumlah 12 tabung yang steril dengan konsentrasi yang berbeda yaitu, 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,156%, 0,078% serta tabung untuk kontrol positif yaitu suspensi bakteri *Escherichia coli* dan larutan stok fraksi teraktif sebagai kontrol negatif. Pengujian dilakukan sebanyak 3 replikasi. Tahap pertama yang dilakukan adalah dengan membuat larutan stok fraksi teraktif dan dilarutkan dengan menggunakan pelarut DMSO 5%. Tahap kedua yaitu tabung 1 digunakan sebagai kontrol negatif yang berisi 2 ml fraksi aktif daun wangon. Selanjutnya tabung ke-2 ditambahkan 1 ml fraksi aktif daun wangon. Tahap selanjutnya tabung 3 sampai 11 masing-masing dipipet 1 ml media BHI secara aseptis. Tabung ke-3 yang sudah berisi fraksi teraktif 1 ml, kemudian dipipet 1 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung ke-4 begitu seterusnya hingga tabung 11 lalu dibuang hasil pipet 1 ml. Tabung 2 sampai 11 diberikan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Tabung sejumlah 12 tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati kekeruhannya.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan cara menentukan konsentrasi terendah larutan uji dari tabung yang jernih. Tabung yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif *Endo Agar* (EA) diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 24-48 jam. Diamati ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media selektif *Endo Agar* (EA) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

12. Identifikasi kandungan kimia fraksi paling aktif secara KLT

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat pada daun wangon. Fraksi yang paling aktif diuji dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi yang dinyatakan paling aktif ditotolkan menggunakan pipa kapiler di atas lempeng kromatografi. Kemudian dielusikan dengan jarak pengembang 5 cm. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) mula-mula dilakukan dengan cara menaikkan cairan pengembang (fase gerak) di dalam suatu bejana (chamber) yang dindingnya telah dilapisi dengan kertas saring. Hal ini menyebabkan atmosfer di dalam bejana dijenuhi dengan fase gerak kemudian, dilakukan elusi sampai fase gerak mencapai batas elusi. Pengembangan yang sudah dilakukan, dilanjutkan dengan pengeringan lempeng Kromatografi Lempeng Tipis, kemudian dilakukan deteksi di bawah sinar UV dan pereaksi lainnya. Bercak yang dideteksi ditentukan harga Rf dan penampakan warnanya. Fase diam menggunakan KLT, lempeng yang digunakan adalah lempeng silika GF₂₅₄ dengan ukuran 10 x 10 cm. Lempeng bisa berupa kaca atau lempeng lain yang cocok.

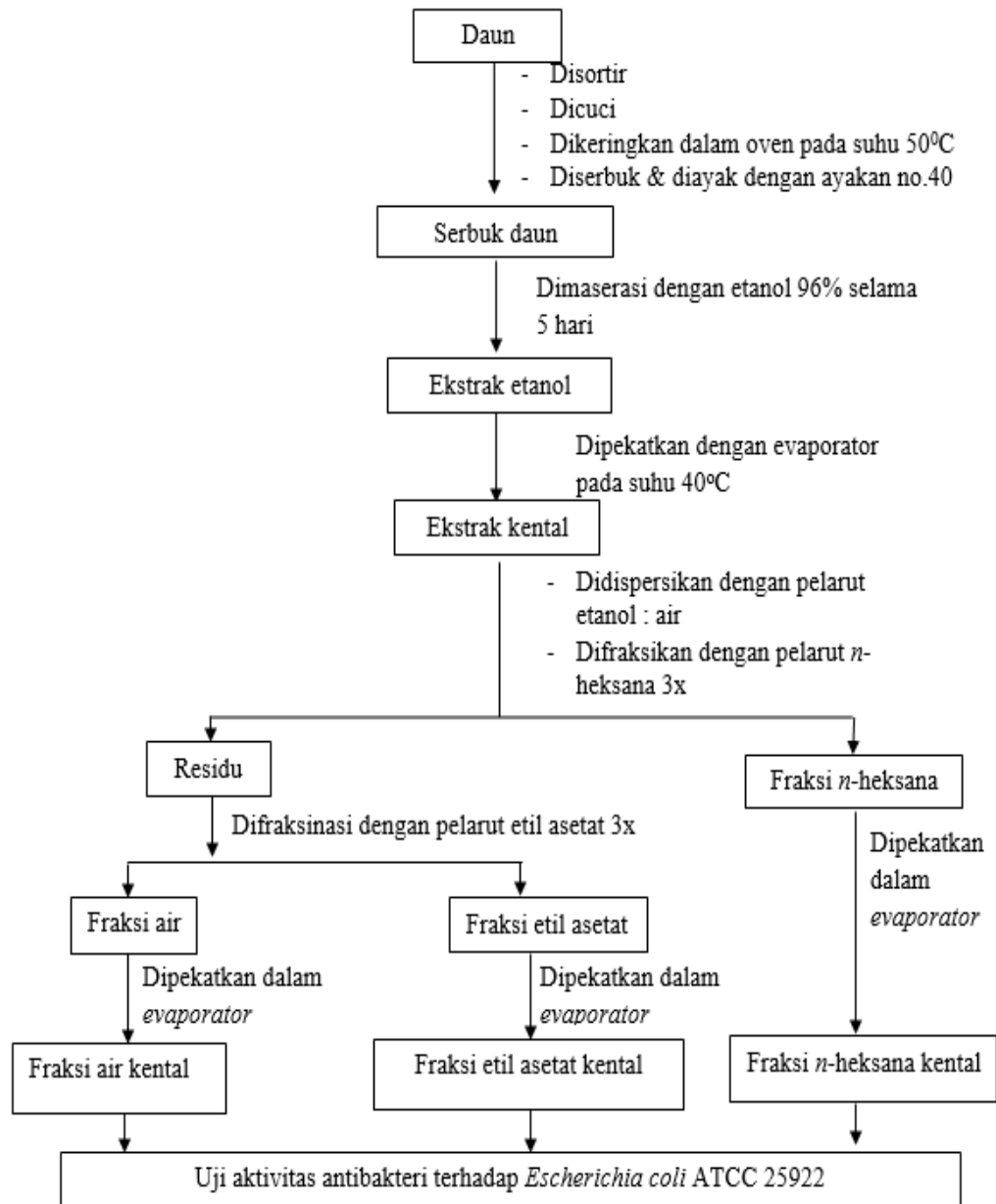
12.1 Identifikasi flavonoid. Identifikasi senyawa flavonoid dengan menggunakan silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak butanol : asam asetat : air (4:1:5). Pereaksi semprot yang digunakan adalah sitroborat. Flavonoid akan berfluoresensi pada sinar UV 366 nm. Hasil positif jika terbentuk fluoresensi kuning, biru atau ungu pada UV 366 nm.

12.2 Identifikasi tanin. Identifikasi adanya senyawa tanin dilakukan dengan menggunakan KLT, dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak butanol : asam asetat : air (4:1:5). Dibawah sinar UV 366 akan berwarna hitam.

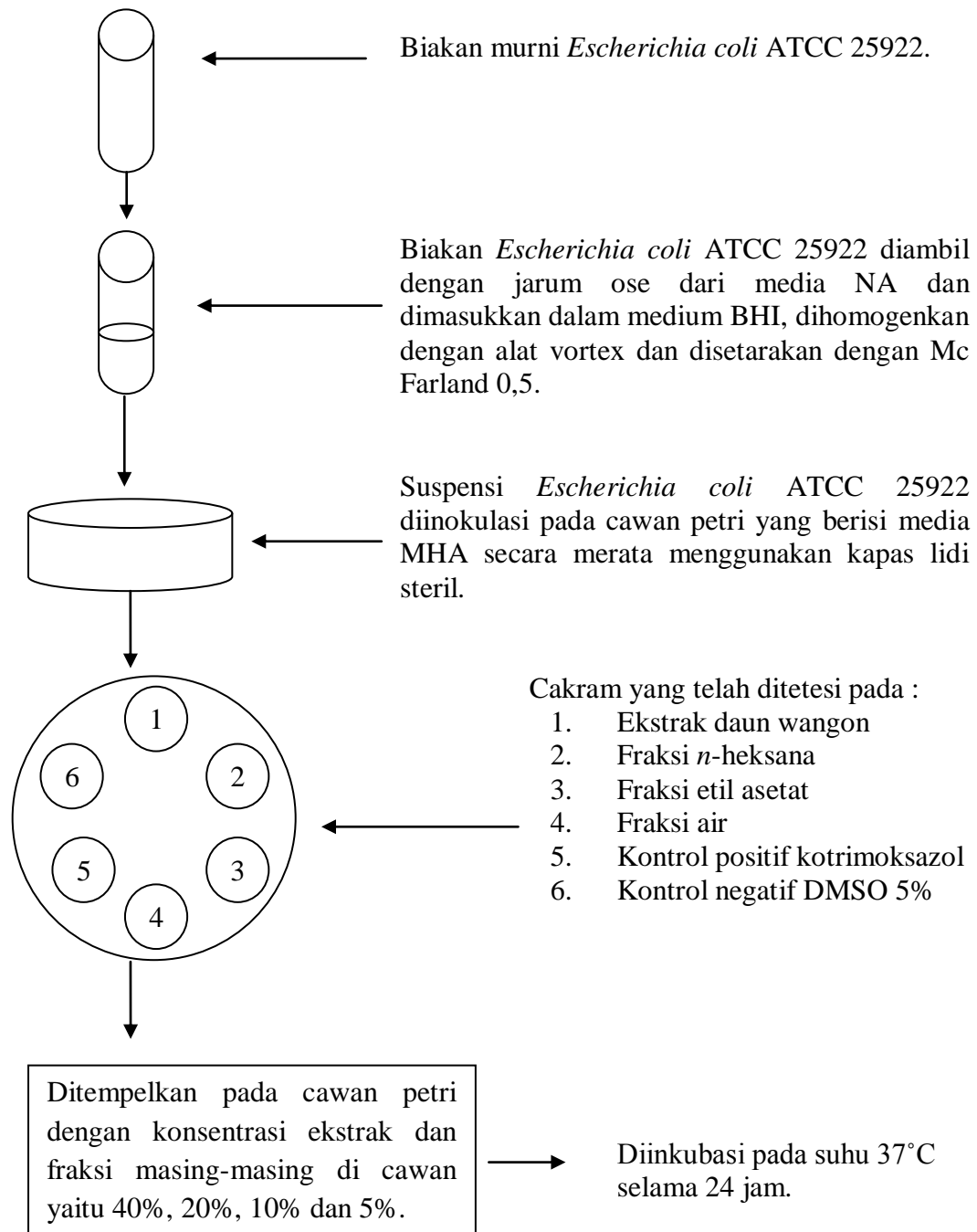
E. Analisis Hasil

Analisis hasil yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 di tabung reaksi dan di media selektif. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *Kolmogorof-*

Smirnov, jika terdistribusi secara normal kemudian dilanjutkan dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) dua jalan (two way) menggunakan software SPSS 17. Tujuan analisa menggunakan metode tersebut adalah untuk mengetahui adanya beda yang nyata atau tidak diameter hambat antara fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol 96% daun wangon dalam berbagai konsentrasi serta kontrol positif dan kontrol negatif.



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun wangen, dan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.



Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri daun wangen terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi.

