

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun karandas (*Carissa carandas* L.) yang tumbuh di Taman Wisata Mekarsari, Bogor, Jawa Barat.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tanaman karandas diambil secara acak dengan memilih daun yang segar, berwarna hijau, bebas dari hama dan penyakit, bersih, tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua yang diambil pada bulan Januari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksan, kloroform, dan air dari daun karandas.

Variabel utama kedua dari penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksan, kloroform, dan air dari daun karandas terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

2. Klasifikasi variabel utama

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

2.1 Variabel bebas. Variabel yang sengaja diubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol 70% daun karandas, fraksi *n*-heksan, fraksi kloroform, dan fraksi air.

2.2 Variabel terkontrol. Variabel yang dianggap mempengaruhi variabel terikat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, kondisi laboratorium (meliputi alat dan bahan harus steril, media yang digunakan dalam penelitian, kondisi inkubasi, suhu inkubasi, waktu panen, dan metode ekstraksi).

2.3 Variabel terikat. Variabel yang dapat dipengaruhi oleh adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan, fraksi kloroform, dan fraksi air dari ekstrak etanol 70% daun karandas.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun karandas adalah daun yang segar, berwarna hijau, bebas dari hama dan penyakit, bersih, tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua yang diambil di Taman Wisata Mekarsari, Bogor, Jawa Barat pada bulan Januari 2019.

Kedua, serbuk daun karandas adalah daun karandas yang berwarna hijau dan segar yang telah diambil kemudian dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, selanjutnya dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 50°C sampai kering, dan dibuat serbuk dengan alat penyerbuk hingga halus, lalu diayak dengan menggunakan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol 70% daun karandas adalah hasil ekstraksi dari serbuk daun karandas menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah ekstrak etanol 70% daun karandas yang selanjutnya difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan sebagai pelarut non polar dengan menggunakan corong pisah.

Kelima, fraksi kloroform adalah sisa hasil fraksinasi dari filtrat *n*-heksan selanjutnya difraksinasi dengan pelarut kloroform sebagai pelarut semi polar.

Keenam, fraksi air adalah sisa hasil fraksinasi dari filtrat kloroform yang selanjutnya diuapkan di *waterbath*.

Ketujuh, bakteri uji dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi. Metode difusi adalah pengamatan dan pengukuran diameter zona bening yang terbentuk di sekitar cakram disk menggunakan jangka sorong, dilakukan pengukuran setelah diinkubasi selama 24 jam. Kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif adalah siprofloksasin konsentrasi 5 μ g. Pengamatan ini untuk melihat zona hambat pertumbuhan bakteri untuk menentukan fraksi teraktif.

Kesembilan, metode dilusi merupakan pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi teraktif untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Konsentrasi hambat minimum adalah konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Konsentrasi bunuh minimum adalah konsentrasi terendah yang dapat membunuh bakteri. Digunakan seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%. Kontrol negatif adalah larutan fraksi teraktif dan kontrol positif adalah suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, erlenmeyer, Beaker glass, batang pengaduk, botol mulut lebar berwarna coklat, selang, corong kaca, corong pisah, kaki tiga, penangas air, timbangan analitik, oven, blender, kertas saring, tabung reaksi, rak tabung, ayakan mesh no. 40, inkas, inkubator, spatel, jarum ose, jarum ent, cawan petri, penyemprot, vortex, vial, pipet ukur, pipet tetes, pipa kapiler, *chamber*, *waterbath*, *sterling bidwell*, *moisture balance*, dan serangkaian alat *rotary evaporator*.

2. Bahan

2.1 Bahan utama. Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah daun karandas (*Carissa carandas* L.). Daun karandas diperoleh dari Taman Wisata Mekarsari, Bogor, Jawa Barat.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah pelarut *n*-heksan, kloroform, etanol 70%, aquadestilata, serbuk Mg, Erlich A, Erlich B, DMSO 5%,

FeCl₃, HCl, Mc Farland, larutan kristal violet (Gram A), larutan mordant (lugol's iodine/Gram B), alkohol 96%/aseton (Gram C), safranin (Gram D), reagen Mayer, reagen Dragendroff, reagen Lieberman Bourchard.

2.3 Medium. Medium yang digunakan adalah *Kliger's Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Sulfida Indo Agar* (SIM), citrat, *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan *Endo Agar* (EA).

2.4 Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui bahan yang digunakan benar-benar daun karandas dan identitas daun karandas yang digunakan untuk bahan uji dalam penelitian ini. Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran ciri-ciri morfologi pada daun karandas sesuai dengan literatur dan dibuktikan pada bagian Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret.

2. Pengambilan bahan

Daun karandas yang digunakan tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau, segar, serta bebas dari hama dan penyakit yang diambil di Taman Wisata Mekarsari, Bogor, Jawa Barat.

3. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk daun karandas dilakukan dengan cara daun karandas dicuci bersih menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel. Daun karandas yang telah bersih kemudian ditimbang, setelah itu dioven pada suhu 50°C. Daun karandas yang telah kering selanjutnya diserbuk dengan alat penyerbuk lalu diayak dengan menggunakan ayakan mesh no. 40 hingga diperoleh serbuk daun karandas.

4. Penetapan kadar air

Pelarut yang akan digunakan adalah *toluen jenuh* air. Kocok sejumlah *toluen P* dengan sedikit air, biarkan memisah, dan buang lapisan air. Bersihkan tabung

penerima dan pendingin dengan asam pencuci, bilas dengan air, kemudian keringkan dalam lemari pengering.

Timbang seksama jumlah bahan yang diperkirakan mengandung 1-4 mL air, masukkan dalam labu kering. Jika zat berupa pasta, timbang dalam sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu. Untuk zat yang dapat menyebabkan gejala mendadak saat mendidih, tambahkan batu didih secukupnya. Masukkan \pm 200 mL toluen jenuh air ke dalam labu, pasang serangkaian alat. Masukkan toluen jenuh air ke dalam tabung penerima melalui pendingin sampai leher alat penampung. Panaskan labu hati-hati selama 15 menit.

Setelah toluen mulai mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan \pm 2 tetes/detik, sampai sebagian besar air tersuling, kemudian naikan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bilas bagian dalam pendingin dengan toluen jenuh air. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima hingga suhu ruang. Jika ada tetes air yang melekat, gosok tabung pendingin dan penerima dengan karet yang diikat pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen jenuh air hingga tetesan air turun. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b. Penetapan kadar air ekstrak etanol daun karandas dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

5. Pembuatan ekstrak etanol

Pembuatan ekstrak daun karandas dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan (1:10). Serbuk daun karandas ditimbang sebanyak 700 gram dan dimasukkan ke dalam botol gelap yang ditambahkan 7000 mL pelarut etanol 70%. Maserat didiamkan selama 6 jam pertama dan digojok sesekali, kemudian didiamkan selama 18 jam. Selanjutnya maserat dan residu dipisahkan, proses penyarian diulangi sekurang-kurangnya satu kali dengan jumlah pelarut setengah kali pelarut yang sama. Semua maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* suhu 40°C sampai didapatkan maserat yang pekat.

Menghitung persen rendemen dengan cara menimbang hasil ekstrak pekat dibagi berat serbuk dan dikali 100% :

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

6. Uji bebas etanol ekstrak daun karandas

Uji bebas etanol ekstrak daun karandas ini dilakukan agar ekstrak tidak mengandung etanol yang memiliki aktivitas antibakteri. Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambahkan asam asetat pekat dan asam sulfat pekat lalu dipanaskan. Uji positif etanol ditandai dengan tercium bau ester yang khas dari etanol. Tujuan uji ini adalah untuk memastikan ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri. Identifikasi senyawa ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

7. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun karandas

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan alat *Moisture balance*. Alat dipanaskan dahulu selama ± 10 menit, ekstrak yang akan diuji ditimbang sebanyak 2 gram di atas wadah aluminium secara merata, sebelumnya alat sudah diatur temperatur pada suhu 105°C . Alat dinyalakan tunggu sampai alat berbunyi yang berarti bobot serbuk sudah konstan. Hasil susut pengeringan dinyatakan dalam satuan persen.

8. Pengujian kandungan senyawa kimia

8.1 Identifikasi alkaloid. Serbuk dan ekstrak daun karandas sebanyak $\pm 0,5$ g dilarutkan dalam aquadest, kemudian ditambahkan 1 mL HCl 2 N dan dibuat dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambah dengan reagen Mayer, akan terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan. Tabung 2 ditambah dengan reagen Dragendroff, akan terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Alamsyah *et al.* 2014).

8.2 Identifikasi flavonoid. Serbuk dan ekstrak daun karandas sebanyak $\pm 0,5$ g dilarutkan dalam aquadest, kemudian dididihkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah serbuk Mg 0,5 mg dan 1 mL HCl pekat serta amil alkohol. Selanjutnya dikocok kuat-kuat dan biarkan memisah. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah *et al.* 2014).

8.3 Identifikasi saponin. Uji busa. Serbuk dan ekstrak daun karandas sebanyak $\pm 0,5$ g dilarutkan dalam 10 mL aquadest, kemudian dikocok kuat dan ditambahkan 1 tetes HCl 2 N dan didiamkan. Hasil positif saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa stabil dengan ketinggian 1-3 cm selama 30 detik (Bintoro 2017).

8.4 Identifikasi tanin. Serbuk dan ekstrak daun karandas sebanyak $\pm 0,5$ g dalam 10 mL air panas, dididihkan selama 15 menit, dan disaring. Filtrat ditambah 5 mL pereaksi besi (III) klorida. Hasil tanin positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna biru kehitaman atau coklat kehitaman (Robinson 1995).

8.5 Identifikasi steroid/triterpenoid. Serbuk dan ekstrak daun karandas sebanyak $\pm 0,5$ g dilarutkan 2 mL kloroform. Ditambahkan 10 tetes asam asetat anhidrat dan 3 tetes H₂SO₄ pekat. Hasil positif mengandung triterpenoid apabila membentuk larutan berwarna merah atau ungu untuk pertama kali, kemudian terjadi perubahan warna menjadi biru dan hijau apabila mengandung steroid (Alamsyah *et al.* 2014).

9. Fraksinasi ekstrak etanol daun karandas

9.1 Pembuatan fraksi *n*-heksan ekstrak etanol daun karandas. Ekstrak etanol 70% sebanyak 10 g yang telah disuspensikan dengan air selanjutnya difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan sebanyak 75 mL dalam corong pisah, fraksi yang ada diatas yaitu fraksi *n*-heksan, dipisahkan dengan fraksi bagian bawah yaitu fraksi air dengan penambahan *n*-heksan sebanyak 3 kali. Fraksi *n*-heksan yang diperoleh kemudian dipekatkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

9.2 Fraksinasi kloroform daun karandas. Filtrat sisa fraksinasi dengan pelarut *n*-heksan difraksinasi dengan pelarut kloroform sebanyak 75 mL dalam corong pisah. Fraksi yang ada diatas adalah fraksi air, dipisahkan dengan fraksi bagian bawah yaitu fraksi kloroform, dengan penambahan kloroform sebanyak 3 kali. Fraksi kloroform yang diperoleh dipekatkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

9.3 Fraksinasi air daun karandas. Sisa hasil fraksinasi dengan pelarut kloroform adalah air. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dipekatkan diatas *waterbath* sampai kental.

10. Sterilisasi

Media dan alat-alat dari kaca yang ada ukurannya harus disterilisasi terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Tabung reaksi dan cawan petri serta alat-alat dari gelas yang tidak ada ukurannya disterilkan dengan menggunakan oven suhu 170-180°C selama 2 jam. Jarum ose disterilkan dengan cara pemanasan api secara langsung. Sterilisasi inkas dengan cara disemprot menggunakan formalin cair (Suriawiria 1986).

11. Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922

11.1 Isolasi bakteri *Escherichia coli*. Inokulasi suspensi bakteri *Escherichia coli* pada media differensial EA (*Endo Agar*) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengujian ditunjukkan dengan terbentuknya koloni berwarna merah dengan kilat logam. Hal ini terjadi karena bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 mampu memfermentasi laktosa sehingga menyebabkan warna *Endo Agar* disekitar koloni merah dengan kilat logam. *Escherichia coli* memfermentasi laktosa menghasilkan asam dan aldehyd dengan bantuan oksidasi yang akan memecah ikatan fuchsin dan sulfit yang ada di medium, sehingga fuchsin membentuk kilat logam dan medium menjadi merah (Volk & Wheller 1988).

11.2 Identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram. Untuk pewarnaan Gram dilakukan dengan pembuatan preparat ulas (smear) yang difiksasi, ditetesi Gram A (kristal ungu) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua terwarnai, kemudian didiamkan selama ± 1 menit, dicuci dengan aquadest mengalir, dan ditetesi dengan mordant (lugol's iodine/Gram B), didiamkan ± 1 menit kemudian dicuci kembali dengan aquadest mengalir dan dikering anginkan. Preparat uji dilunturkan dengan peluntur Gram C (etanol 96%) selama 30 detik. Preparat ditetesi counterstain (safranin/Gram D) didiamkan ± 45 detik, dicuci dengan aquadest mengalir, dan dikeringkan menggunakan tisu yang ditempelkan disisi ulasan dan didiamkan sampai kering. Amati preparat uji dengan mikroskop perbesaran 100x (Volk & Wheller 1988).

11.3 Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan uji biokimia. Media SIM (*Sulfide Indol Motility*) merupakan media berbentuk semi solid dan tegak, berwarna kuning muda, untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan

motilitas. Biakan bakteri ditusukkan dengan jarum Ent pada media SIM, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji sulfida positif jika media terbentuk warna/endapan hitam. Uji indol positif jika media terbentuk warna merah setelah penambahan 5 tetes reagen Erlich A dan reagen Erlich B. Uji motilitas positif jika terbentuk pertumbuhan koloni pada bekas tusukan media yang artinya bakteri melakukan pergerakan (motil). Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan sulfide negatif, indol positif, motility positif (- + +).

Sulfida (H_2S) terbentuk karena reaksi antara ion S^{2-} dan ion Fe^{3+} maka terbentuk Fe_2S_3 (endapan hitam). Terbentuknya indol dengan H_2S dan enzim triptophanase dalam media, akan terbentuk indol + piruvat + NH_3 + reagen Kovac's (Erlich) membentuk paradimetilaminobenzaldehyde yang berwarna merah (Harti 2015).

Media KIA (*Kliger's Iron Agar*) merupakan media berbentuk padat dan miring, berwarna merah, untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dan sulfida. Biakan bakteri diinokulasi pada medium dengan cara inokulasi tusukan dan goresan lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati bagian lereng dan dasar, terbentuknya gas, serta warna hitam pada media. Hasil positif sulfida apabila terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+), terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+). Uji positif asam pada bagian lereng atau dasar terjadi perubahan warna pada media menjadi kuning (ditulis A/A). Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan dengan A/AGS⁻.

Sulfida (H_2S) yang terbentuk karena adanya reaksi antara ion S^{2-} dan ion Fe^{3+} , maka akan terbentuk Fe_2S_3 (endapan hitam). Terbentuknya asam karena bakteri dapat memfermentasikan glukosa dan laktosa pada media menjadi asam. Media KIA mengandung indikator phenol red (merah phenol) dengan pH 6,8-8,4 maka dalam suasana asam media akan berubah menjadi kuning (Harti 2015).

Media LIA (*Lysin Iron Agar*) merupakan media berbentuk padat dan miring, berwarna ungu, untuk mengetahui terbentuknya sulfida, deaminasi, atau dekarboksilasi lisin. Biakan bakteri diinokulasi dalam media dengan cara inokulasi tusuk dan gores, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji positif sulfida ditandai dengan terbentuknya warna/endapan hitam (S+). Uji positif

deaminasi lisin berwarna merah coklat (R), negatif berwarna ungu (K). Uji positif dekarboksilasi lisin ditandai dengan media berwarna ungu (K). Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan dengan K/KS⁻.

Mikroorganisme mereduksi natrium tiosulfat dalam media, maka terbentuk H₂S yang bereaksi dengan ion Fe²⁺ membentuk FeS (endapan hitam). Deaminasi lisin terjadi karena bakteri menghasilkan asam amino kaproat sebagai asam karboksilat yang bereaksi dengan ion Fe dan adanya pengaruh oksigen akan terbentuk warna merah coklat. Dekarboksilasi lisin terjadi karena bakteri melakukan dekarboksilasi lisin menghasilkan *cadaverine* (pentameten diamin) yang bersifat basa, adanya indikator *Bromo Cresol Purple* (BCP) pH 5,2 – 6,8 akan berwarna ungu (Harti 2015).

Media Citrat merupakan media berbentuk padat, miring, berwarna hijau. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan gores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji citrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Perubahan warna media menjadi biru menunjukkan hasil positif, jika bakteri menggunakan natrium citrat sebagai sumber karbon tunggal, maka akan dibebaskan ion hidroksida yang bersifat basa. Dalam media citrat mengandung indikator *Bromo Thymol Blue* (BTB) dengan pH 6,0-7,6 sehingga dalam suasana basa media akan berubah yang semula warna hijau berubah menjadi biru. Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan dengan hasil citrat negatif (Harti 2015).

12. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Escherichia coli* yang diambil dari biakan murni sekitar 2 ose dan ditanam dalam tabung berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakan bakteri yang telah diinkubasi dikeruhkan dan disesuaikan dengan kekeruhannya yaitu 0,5 McFarland yang dianggap setara dengan 1,5x10⁸ CFU/mL. Suspensi yang telah distandarkan selanjutnya dilakukan pengenceran hingga 10⁻³ untuk meningkatkan sensitivitas agen antimikroba terhadap mikroba uji dan jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian (Bonang & Koeswando 1982).

13. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari *n*-heksan, kloroform, dan air dari daun karandas secara difusi

Fraksi *n*-heksan, kloroform, dan air yang didapatkan dari hasil ekstrak etanol 70% daun karandas yang dimaserasi selama 2 hari diuji aktivitas antibakteri dengan menggunakan bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922. Metode yang digunakan yaitu metode difusi.

Prosedur kerja metode difusi menggunakan 3 cawan petri steril yang telah diisi dengan media MHA sebanyak 50 mL. Secara aseptis goreskan suspensi bakteri pada cawan petri menggunakan kapas lidi steril dengan metode perataan dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Dipipet larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksan, kloroform, dan air kemudian diteteskan pada cakram yang telah disterilkan sebelumnya, didiamkan selama 10-20 menit pada suhu kamar. Kertas cakram yang telah dijenuhkan selanjutnya diletakkan diatas media, siprofloksasin disc dengan konsentrasi 5 μ g sebagai kontrol positif, dan kertas cakram yang ditetesi DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Pengujian dilakukan dengan 3 seri konsentrasi 50%; 25%; dan 12,5%, dan amati ada tidaknya daya hambat dalam ukuran mm dibandingkan dengan kontrol positif siprofloksasin. Daerah cakram yang tidak ditumbuhi oleh bakteri yang berisi larutan uji menunjukkan bahwa ekstrak dan hasil fraksi daun karandas memiliki daya hambat terhadap bakteri uji (Bonang & Koeswando 1982).

14. Pengujian aktivitas antibakteri dari daun karandas secara dilusi

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah sediaan yang dapat menghambat dan membunuh bakteri uji. Pengujian menggunakan 10 tabung reaksi steril, dibuat seri konsentrasi yang berbeda yaitu 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; dan 0,195%, kontrol positif (suspensi bakteri uji *Escherichia coli*), dan kontrol negatif (fraksi kloroform 50%). Media *Brain Heart Infusion* (BHI) sebanyak 0,5 mL dimasukkan pada setiap tabung kecuali tabung 1 dan tabung 10. Tabung 1 diisi larutan stok hasil fraksi teraktif (kontrol negatif) sebanyak 1 mL, tabung 10 diisi dengan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 sebanyak 1 mL (kontrol positif). Tabung 2 diisi 0,5 mL larutan stok fraksi teraktif yang sebelumnya telah berisi BHI 0,5 mL kemudian dihomogenkan dengan

divortex, dari tabung 2 diambil 0,5 mL dan dimasukkan dalam tabung 3 dan begitu seterusnya sampai tabung 9 dan diambil 0,5 mL lalu dibuang. Dari tabung 2 sampai tabung 9 masing-masing dimasukkan 0,5 mL suspensi *Escherichia coli* ATCC 25922. Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dan diamati kekeruhannya.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan cara menentukan konsentrasi terendah larutan uji dari tabung yang jernih. Tabung yang jernih diinokulasikan pada media selektif MacConkey secara goresan, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Amati ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media MacConkey. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media MacConkey yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

15. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk memastikan kandungan senyawa yang terkandung dalam fraksi teraktif ekstrak etanol 70% daun karandas. Ekstrak atau fraksi dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, ditotolkan pada lempeng KLT, dikering anginkan. Lempeng KLT yang sudah kering dimasukkan dalam *chamber* berisi fase gerak jenuh yang sesuai. Pengembangan dilakukan sampai jarak tertentu, dan dilakukan deteksi di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Bercak yang terdeteksi dihitung harga R_f dan dilihat penampakan warnanya.

15.1 Identifikasi alkaloid. Senyawa alkaloid dapat diidentifikasi dengan menggunakan KLT, fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF₂₅₄, fase geraknya yaitu kloroform : etanol (94 : 4). Lempeng KLT dideteksi di bawah sinar UV₂₅₄ nm akan memberi warna jingga, dan sinar UV₃₆₆ nm berwarna biru atau kuning. Pereaksi semprot yang digunakan adalah pereaksi Dragendroff, memberi noda berwarna coklat atau jingga pada sinar tampak (Budiman *et al.* 2010).

15.2 Identifikasi flavonoid. Senyawa flavonoid dapat diidentifikasi dengan menggunakan KLT, fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan yaitu *n*-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) dengan pereaksi semprot sitroborat/uap amoniak. Pembanding rutin yang biasa dipakai untuk mengisolasi senyawa flavonoid ialah kuersetin. Apabila dideteksi di sinar UV₂₅₄ nm

memberikan peredaman, pada sinar UV₃₆₆ nm akan berfluoresensi biru, kuning, atau ungu gelap. Setelah diuapi amonia berwarna kuning yang cepat memudar, dan berwarna kuning setelah disemprot sitroborat dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. (Koirewoa *et al.* 2012).

15.3 Identifikasi tanin. Tanin dapat diidentifikasi dengan KLT, menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah butanol : asam asetat : air (3 : 1 : 1). Baku pembanding yang digunakan adalah asam galat. Pereaksi semprot yang digunakan yaitu FeCl₃, hasil positif mengandung tanin apabila terbentuk warna ungu kehitaman pada sinar tampak (Nuria *et al.* 2009).

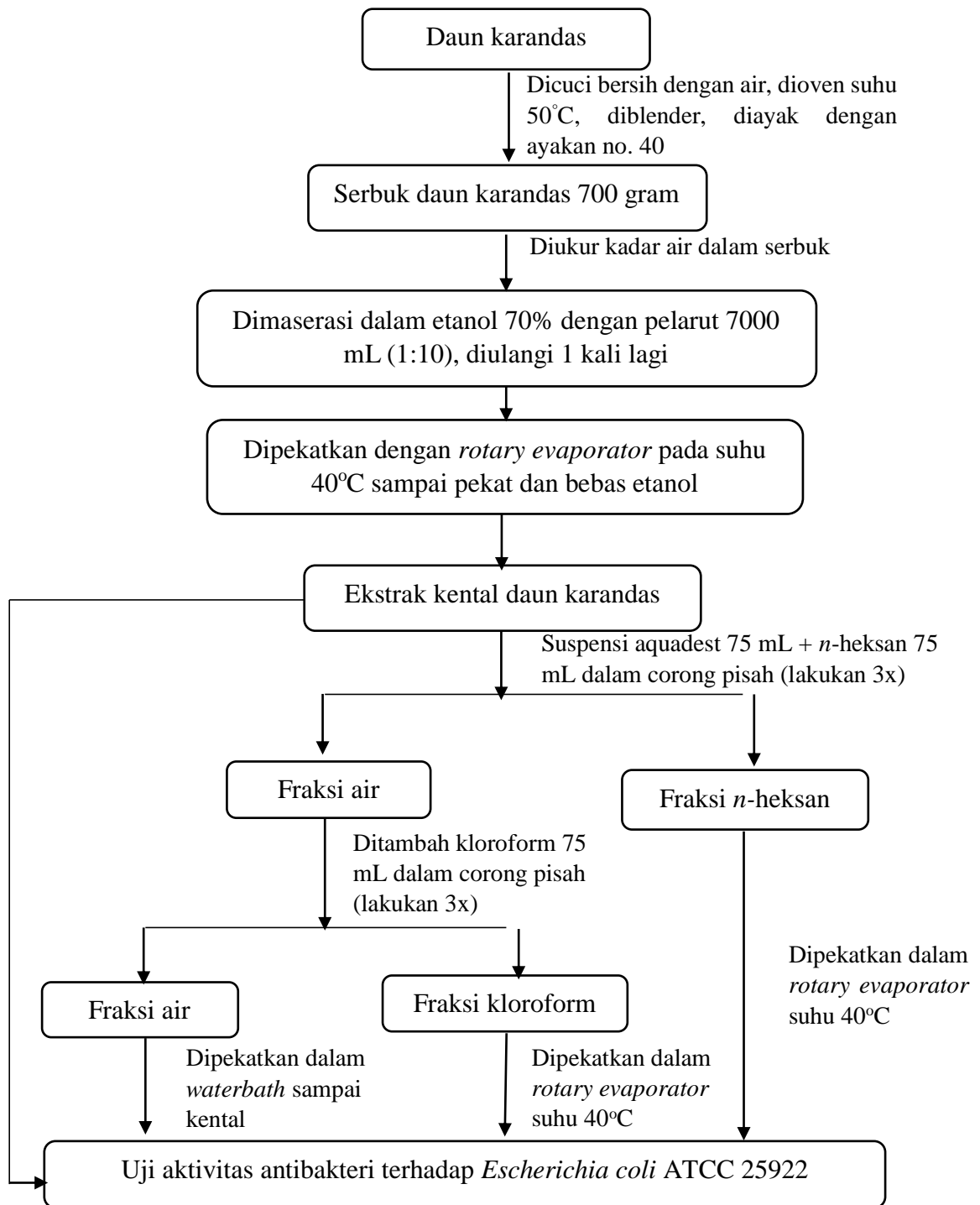
15.4 Identifikasi triterpenoid. Triterpenoid dapat diidentifikasi dengan menggunakan KLT. Fase diam yang digunakan silika gel GF₂₅₄, fase gerak yang digunakan adalah heksana : etil asetat (1 :1) atau kloroform : metanol (10:1). Senyawa triterpenoid asam betulinat, asam oleanolat, dan asam ursolat memerlukan pengembangan khusus, fase gerak yang digunakan yaitu eter minyak bumi (titik didih 100-130°C) : dikloroetilene : asam asetat (50 : 50 : 0,7) (Harborne 1987). Pereaksi semprot yang digunakan yaitu *Lieberman Bourchard* (LB) (dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit). Hasil positif triterpenoid dengan fluoresensi berwarna biru kehijauan di bawah sinar UV 366 nm, dan berwarna ungu atau biru pada sinar tampak (Murdianto *et al.* 2013).

15.5 Identifikasi steroid. Steroid dapat diidentifikasi menggunakan KLT dengan fase diam silika gel GF₂₅₄, fase gerak yang digunakan yaitu heksan : etil asetat (1 : 1) atau kloroform : metanol (10 : 1). Senyawa steroid stigmasterol dan β-sitosterol diidentifikasi dengan menggunakan KLT, fase gerak yang digunakan toluen : etil asetat : kloroform (5 : 1 : 4). Baku pembanding yang digunakan ialah stigmasterol. Pereaksi semprot yang digunakan *Lieberman Bourchard* (LB), positif mengandung steroid apabila memberikan warna ungu atau biru setelah dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Positif mengandung steroid bila terbentuk warna biru ungu sampai coklat saat dideteksi di bawah sinar UV₃₆₆ nm (Risnafiani 2015).

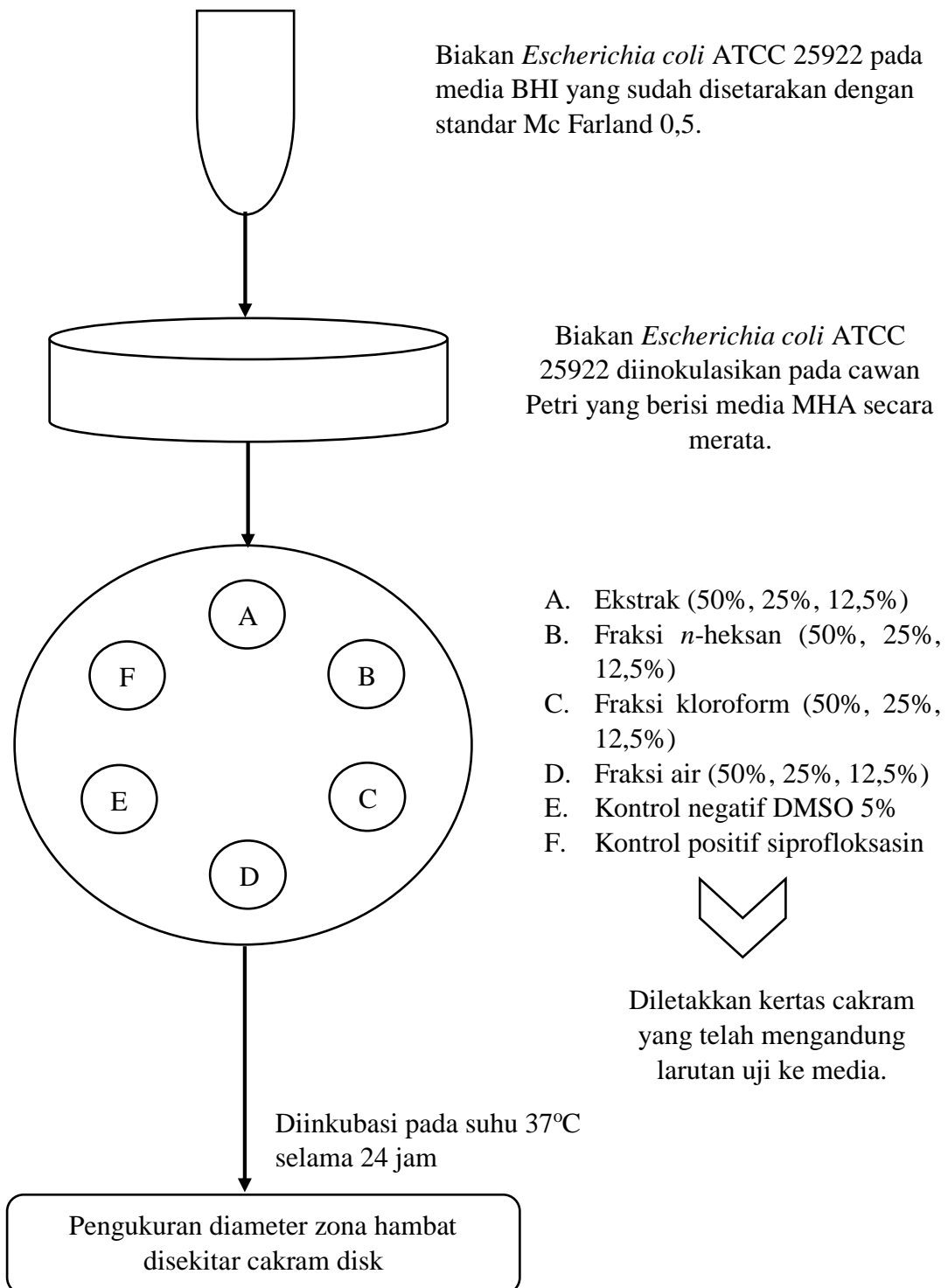
E. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan melihat aktivitas antibakteri dari fraksi kloroform terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC

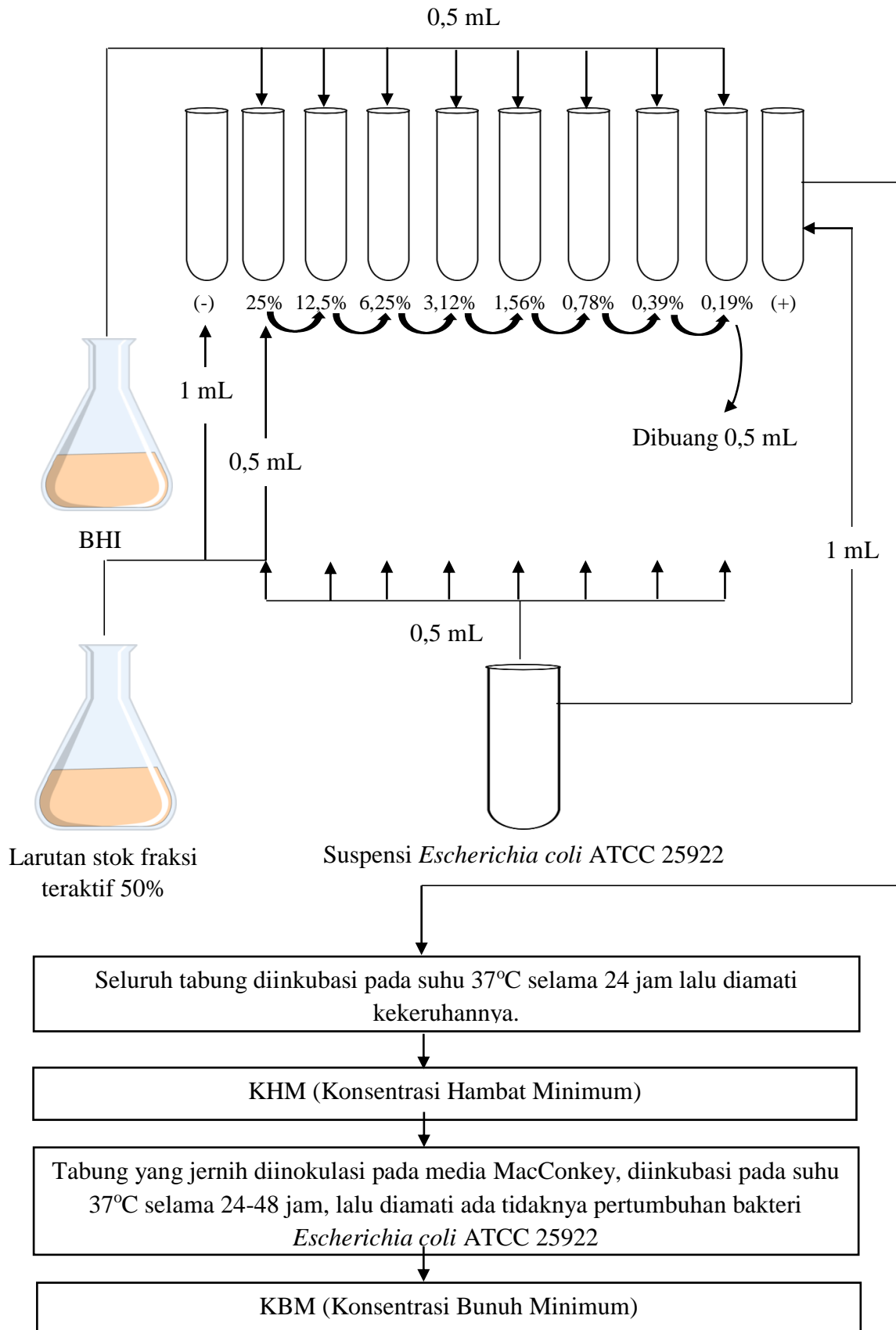
25922 secara difusi dan dilusi. Metode analisis pada penelitian ini dengan melihat dahulu apakah data terdistribusi normal atau tidak, dengan menggunakan uji distribusi normal (*Kolmogorov-Smirnov*), bila tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan metode uji non parametrik, sedangkan bila terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA).



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol 70% dan fraksinasi daun karandas



Gambar 2. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan, kloroform, dan air ekstrak etanol 70% daun karandas terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi



Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif (*n*-heksan, kloroform, dan air) dari ekstrak daun karandas terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode dilusi