

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) yang diperoleh dari Desa Tinap, Kecamatan Sukomoro, Kabupaten Magetan, Jawa Timur.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) yang diambil secara acak. Daun diambil dalam kondisi yang muda, segar, berwarna hijau dan bebas dari hama. Daun diperoleh pada bulan februari 2019 dari Desa Tinap, Kecamatan Sukomoro, Kabupaten Magetan, Jawa Timur.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kari menggunakan pelarut etanol 70% kemudian difraksinasi menggunakan *n*-heksana sebagai pelarut nonpolar, etil asetat sebagai pelarut semipolar dan air sebagai pelarut polar.

Variabel utama kedua adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 70%, fraksi menggunakan *n*-heksana, etil asetat dan air daun kari terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2. Klasifikasi variabel utama

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

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas

dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol 70% daun kari dengan berbagai konsentrasi.

2.2. Variabel terkontrol. Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kondisi laboratorium (meliputi: kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, waktu pengamatan, waktu panen, tempat tumbuh tanaman, metode ekstraksi dan fraksinasi.

2.3. Variabel terikat. Variabel terikat adalah variabel titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang dipengaruhi oleh fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun kari.

3. Definisi operasional variabel utama

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

Kedua, serbuk daun kari yaitu serbuk yang diperoleh dari daun kari yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir dimaksudkan agar kotoran yang menempel dapat hilang. Daun kari kemudian dikeringkan dengan oven suhu 50°C, selanjutnya diblender dan diayak dengan pengayak nomor 40. Ayakan nomor 40 dipilih agar serbuk bisa tersaring dan ukuran partikelnya lebih kecil sehingga hasil yang diperoleh lebih maksimal.

Ketiga, ekstrak maserasi daun kari adalah hasil ekstraksi serbuk daun kari yang dibuat dengan cara mengekstrak serbuk dengan pelarut etanol 70% menggunakan proses maserasi kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan dilanjutkan dengan fraksinasi.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah ekstrak dari etanol 70% daun kari yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut nonpolar, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapat fraksi *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksinasi yang didapat dari lapisan air dari fraksi *n*-heksana yang kemudian difraksinasi dengan etil asetat sebagai pelarut semipolar, kemudian dipisahkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah fraksinasi yang didapat dari lapisan air fraksi etil asetat yang kemudian difraksinasi dengan air sebagai pelarut polar, kemudian dipisahkan dengan *waterbath* sehingga didapat fraksi air.

Ketujuh, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah bakteri Gram positif yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, metode difusi dengan menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif adalah ciprofloksasin.

Kesembilan, metode dilusi dengan menentukan konsentrasi daya bunuh minimum (KBM) yaitu berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,15625%, 0,078125%. Kontrol negatif adalah fraksi teraktif dan kontrol positif adalah suspensi bakteri.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan antara lain: oven, ayakan nomor 40, blender untuk membuat serbuk, mesin penggiling, alat maserasi berupa botol mulut lebar warna coklat, gelas ukur, bunsen, kaki tiga, kertas saring, selang, corong pisah, *rotary evaporator*, timbangan analitik, erlenmeyer, pipet tetes, pipet volume, pinset, beaker glass, kain flannel, batang pengaduk, tabung reaksi, cawan petri, inkas, jarum Ose, chamber, kapas lidi steril, vial, spuit, labu alas bulat, rak tabung, kertas cakram, mikroskop, *moisture balance*, tissue, alat tulis, masker, autoklaf, inkubator, *waterbath*, *Sterling Bidwell*, lempeng KLT.

2. Bahan

2.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) segar yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut *n*-heksana, etil asetat, Mc Farland 0,5, etanol 70%, aquadestilata, toluen, HCl 2N, bubuk Mg, FeCl₃, DMSO 5%, larutan Dragendorf, Mayer, kalium telurit 3,5%, hidrogen peroksida, asam asetat glasial, asam sulfat pekat, asam klorida pekat, amil alkohol, rutin, papaverin, asam galat, gliserisin, stigmasterol, Ciprofloksasin, cat kristal violet, larutan lugol iodin dan safranin, metanol, butanol, kloroform, Sitroborat, Liberman-Burchard.

2.3. Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

2.4. Medium. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Vogel Johnson Agar* (VJA) dan *Mueller Hintor Agar* (MHA).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah identifikasi tanaman kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) yang dilakukan di Laboratorium Morfologi Tumbuhan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Identifikasi ini bertujuan untuk mencocokkan ciri makroskopis dan mikroskopis, selain itu juga berfungsi untuk mencocokkan ciri morfologi yang ada pada daun kari.

2. Pembuatan serbuk daun kari

Daun kari sebanyak 8kg dibersihkan dengan cara dicuci bersih pada air mengalir agar terbebas dari kotoran dan debu, kemudian dikeringkan dengan oven suhu 50°C. Daun kari dikeringkan, diserbuk dengan alat penggiling dan diayak

dengan ayakan nomor 40. Diperoleh serbuk daun kari yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen.

3. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan daun kari dilakukan dengan alat *Moisture Balance*. Caranya temperatur diatur yaitu pada suhu 105°C serta waktu pengeringan secara manual hingga kering. Serbuk daun kari sebanyak 2 gram dimasukkan dalam alat *Moisture Balance* ditutup dan ditunggu sampai ada bunyi pada alat sebagai tanda. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat *moisture balance* dicatat sebagai kadar kelembaban. Tujuan dari susut pengeringan adalah untuk memberikan batas maksimal (rentang) besarnya senyawa volatil yang hilang selama proses pengeringan. Susut pengeringan memenuhi syarat apabila tidak lebih dari 10% (Depkes 2000).

4. Pembuatan ekstrak daun kari

Pembuatan ekstrak daun kari dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Serbuk daun kari sebanyak 800 gram dimasukkan ke dalam botol, ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 6000 mL. Ekstraksi dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojog berulang-ulang. Maserat yang didapatkan selama 5 hari diperas dengan kain flanel dan disaring. Residu kemudian ditambahkan etanol 2000 mL dimasukkan ke dalam botol dengan sekali diaduk dan dibiarkan selama 2 hari. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes 1986). Persen rendemen diperoleh dari menimbang hasil ekstrak kemudian dibagi serbuk daun kari kering dikalikan 100%.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

5. Penetapan kadar air ekstrak daun kari

Penetapan kadar air daun kari dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Caranya dengan ditimbang ekstrak daun kari sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam labu destilasi. Ditambahkan pelarut toluen jenuh air sebanyak 200 ml (toluen jenuh air dibuat dengan cara mengocok 200 ml toluen dengan 10 ml air, biarkan memisah dan buang lapisan air) sampai ekstrak

terendam, kemudian dipasang alat *Sterling-Bidwell*, tahap selanjutnya dipanaskan dengan api kecil. Pemanas dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi, kemudian diukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala alat tersebut dan dihitung persen kadar airnya (Depkes 1995).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume terbaca}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

6. Uji bebas etanol

Ekstrak yang telah pekat diuji sudah bebas etanol atau belum dengan cara uji esterifikasi. Uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Uji negatif bebas etanol jika tidak tercium bau ester yang khas dari etanol. Tujuan dilakukannya tes bebas etanol ini bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri (Kurniawati 2015).

7. Penetapan bobot jenis ekstrak etanol daun kari

Penetapan bobot jenis ekstrak etanol daun kari menggunakan piknometer. Piknometer yang bersih, kering ditimbang (W_0). Kemudian dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru, dididihkan pada suhu 25°C kemudian ditimbang (W_1). Ekstrak diencerkan sebesar 5% dengan etanol 70% diatur suhunya kurang lebih 20°C lalu dimasukkan dalam piknometer kosong, ekstrak yang kelebihan dibuang. Diatur suhu piknometer yang telah diisi hingga suhu 25°C kemudian ditimbang (W_2) (Depkes RI 2000).

$$\text{Bobot jenis (d)} = \frac{\text{bobot piknometer+ekstrak (W2)} - \text{bobot piknometer kosong(W0)}}{\text{bobot piknometer+air (W1)} - \text{bobot piknometer kosong(W0)}}$$

8. Pengujian kandungan kimia ekstrak daun kari

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak daun kari dan semua fraksi dari ekstrak daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng).

8.1. Identifikasi alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan metode Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Sebanyak 0,5g ekstrak ditambah dengan 1 ml HCl 2 M dan 9 ml *aquadest* dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian, masing-masing ditambah

dengan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Baku pembanding yang digunakan papaverin. Terbentuknya endapan putih pada pereaksi Mayer menunjukkan hasil yang positif pada alkaloid, terbentuknya warna coklat kemerahan pada pereaksi Wagner menunjukkan hasil positif alkaloid, dan terbentuknya warna jingga pada pereaksi Dragendorff menunjukkan hasil positif alkaloid (Setyowati *et al.* 2014).

8.2. Identifikasi flavonoid. Ekstrak sebanyak 0,5g dicampurkan dengan aquadestilata. Ekstrak kemudian didihkan selama 5 menit dan disaring. Kemudian filtrat ditambahkan 0,1 g bubuk Mg dan ditambahkan 1 ml HCl pekat dan 1 ml amil alkohol. Dicampur dan dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Baku pembanding yang digunakan rutin. Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Noer *et al.* 2018).

8.3. Identifikasi saponin. Ekstrak diambil sebanyak 0,5g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquadest hingga seluruh sampel terendam, didihkan selama 2-3 menit dan selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat. Baku pembanding yang digunakan gliserisin. Hasil positif akan terbentuk busa yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit. Pada penambahan HCl pekat beberapa tetes, buih tidak hilang (Illing *et al.* 2017).

8.4. Identifikasi tanin. Ekstrak diambil sebanyak 0,5g diencerkan dengan 10 mL aquadest kemudian disaring, filtrat tersebut ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Baku pembanding yang digunakan asam galat. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya golongan tanin (Widiastuti *et al.* 2014).

8.5. Identifikasi steroid. Identifikasi steroid dilakukan dengan metode Lieberman–Burchard. Sebanyak 0,5g sampel ditambahkan asam asetat glasial sebanyak 10 tetes dan asam sulfat pekat 2 tetes. Larutan dikocok perlahan, dibiarkan selama beberapa menit. Baku pembanding yang digunakan stigmasterol. Steroid memberikan warna biru atau hijau, dan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Tonius *et al.* 2016).

9. Fraksinasi

Fraksinasi dari ekstrak etanol 70% daun kari dengan cara ditimbang 10g ekstrak kental hasil maserasi. Ekstrak kental yang sudah ditimbang dilarutkan dengan etanol dan aquadestilata kemudian dipisahkan dicorong pisah dengan ditambahkan *n*-heksana. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan disebut sebagai fraksi *n*-heksana.

Residu dari fraksinasi *n*-heksana dipisahkan dicorong pisah dengan ditambahkan etil asetat. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* kemudian ditimbang dan disebut sebagai fraksi etil asetat. Residu dari fraksi etil asetat dipekatkan dengan cara dibiarkan menguap pada suhu kamar, karena masih terdapat kandungan air yang cukup banyak maka dipekatkan kembali menggunakan waterbath suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ lalu ditimbang dan disebut sebagai fraksi air.

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi untuk uji difusi dilakukan dengan biakan murni diambil kurang lebih 1 jarum ose bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Suspensi dibuat dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah diinkubasi kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Tujuannya agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan kepadatan bakteri berkurang saat pengujian (Bonang *et al.* 2002).

11. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

11.1. Identifikasi bakteri dengan cawan gores. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasi pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah ditetesi 3 tetes kalium telurit 3,5% dalam cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Dinyatakan positif *Staphylococcus aureus* apabila terbentuk koloni hitam dan zona kuning di sekitar koloni.

11.2. Pewarnaan. Pewarnaan Gram bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama) 2-3 tetes selama 2 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan.

Diberi Gram B (lugol iodine sebagai mordan) 2-3 tetes selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan setelah itu, ditetaskan Gram C (etanol: aseton = 1:1 sebagai peluntur) selama 1 menit. Diberi Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup) 2-3 tetes selama 1 menit dan dikering anginkan. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dinyatakan bersifat Gram positif apabila selnya terwarnai ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati dibawah mikroskop dan dikatakan negatif apabila selnya terwarnai merah.

11.3. Identifikasi biokimia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada medium BHI dengan penambahan H₂O₂ 3%. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara sebab *Staphylococcus aureus* memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂. Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini menginaktifkan enzim dalam sel. Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob akan menguraikan bahan tersebut (Jawetz *et al.* 2007).

Uji koagulase dapat menggunakan plasma darah kelinci. Plasma darah diberi asam sitrat, diencerkan (1:5) ditambah suspensi bakteri uji pada media BHI, diinkubasi pada suhu 37°C. Tabung diperiksa dengan melihat pembentukan selama 1-4 jam. Hasilnya positif kuat jika tabung dibalik, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung (Jawetz *et al.* 2007).

12. Pengujian antibakteri daun kari secara difusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta. Fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun kari yang diperoleh diuji secara difusi ke bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Metode yang digunakan yaitu cakram disk. Larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dibuat masing-masing tiga konsentrasi yaitu 40%, 20% dan 10%. Dipipet 30µl larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air kemudian ditetaskan dalam kertas cakram yang telah disterilkan. Kertas cakram yang telah dijenuhkan

diletakkan pada media MHA yang telah diinokulasi dengan bakteri. Sebagai kontrol positif diletakkan pula kertas cakram ciprofloksasin. Sebagai kontrol negatif diletakkan pula kertas cakram yang telah ditetesi DMSO 5 %. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling cakram. Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya dan diukur diameter zona hambat sekitar cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri menandakan bahwa kandungan kimia daun kari memiliki daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

13. Pengujian antibakteri daun kari secara dilusi

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah sediaan yang dapat menghambat dan membunuh bakteri uji. Metode dilusi menggunakan 12 tabung steril. Secara aseptis dari larutan stok tersebut dibuat seri konsentrasi pengenceran mulai dari 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625; 0,078125%. Kontrol positif menggunakan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada tabung terakhir dan kontrol negatif menggunakan fraksi etil asetat pada tabung pertama. Secara aseptis media BHI dimasukkan 0,5 mL pada tabung ke 3 sampai tabung ke 11. Kemudian dimasukkan 1 mL larutan fraksi etil asetat dengan konsentrasi teraktif pada tabung ke 1 dan larutan fraksi etil asetat sebanyak 0,5 ml pada tabung ke 2 dan ke 3 dipipet sebanyak 0,5 dari tabung 3 dan dimasukkan dalam tabung 4 dan dihomogenkan hingga merata begitu seterusnya sampai tabung ke 11 lalu dibuang 0,5 ml. Dimasukkan suspensi *Staphylococcus aureus* sebanyak 0,5 mL pada tabung ke 2 sampai tabung ke 11. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya dan ditentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu batas terendah tabung yang jernih. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara semua tabung dilakukan inokulasi bakteri pada media VJA yang ditetesi kalium tellurit 1% dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Amati ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh

konsentrasi terendah pada media selektif *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

14. Identifikasi kandungan kimia fraksi teraktif secara KLT

Identifikasi kandungan kimia bertujuan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat pada fraksi teraktif daun kari. Fraksi yang paling aktif ditotolkan dengan pipa kapiler di atas lempeng kromatografi. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) mula-mula dilakukan dengan cara cairan pengembang (fase gerak) di dalam suatu bejana (chamber) yang dindingnya telah dilapisi dengan kertas saring sehingga 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 lapis tipis, kemudian dilakukan deteksi di bawah sinar UV dan pereaksi lainnya. Bercak yang di deteksi ditentukan harga Rf dan penampakan warnanya.

14.1. Identifikasi alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menggunakan KLT dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya menggunakan etil asetat : methanol : air (4:5:1). Baku pembanding yang digunakan papaverin. Pereaksi semprot yang digunakan yaitu Dragendorf yang akan menunjukkan bercak berwarna coklat jingga. Pada UV 366 nm, alkaloid akan berfluoresensi biru, biru-hijau atau ungu (Sari dan Susilo 2017).

14.2. Identifikasi flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menggunakan KLT dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan fase gerak N-butanol : asam glisial : air (4:1:5). Baku pembanding yang digunakan rutin. Pereaksi semprot yang digunakan yaitu sitoborat yang akan menunjukkan bercak berwarna kuning atau kuning-coklat. Flavonoid akan berfluoresensi biru, kuning atau hijau bila tanpa pereaksi dibawah UV 366 (Depkes RI 1995).

14.3. Identifikasi saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan menggunakan KLT. Fase gerak yang digunakan yaitu kloroform:metanol:air (13:7:2). Baku pembanding yang digunakan gliserisin. Pereaksi semprot yang digunakan Liberman-Burchard dengan pereaksi ini saponin membentuk bercak biru sampai violet, terkadang bercak berwarna merah, kuning, biru tua, ungu,

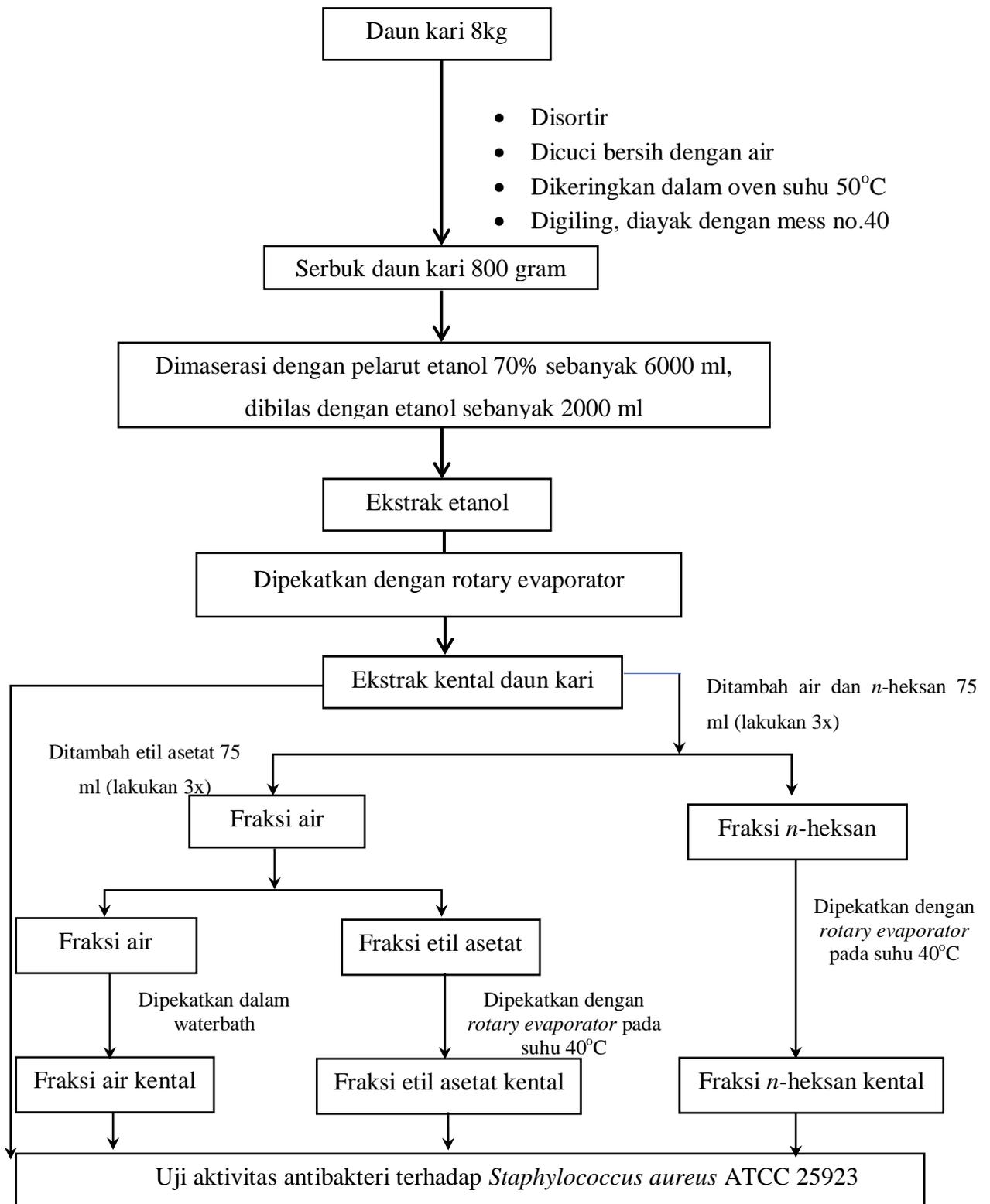
hijau, atau berupa coklat kuning pada sinar tampak dan pada sinar UV 365 nm bercak tidak berfluoresensi (Wagner & Bladt 1996).

14.4. Identifikasi tanin. Senyawa tanin dapat diidentifikasi dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak *n*-heksana-etil asetat (6:4) dengan penampak noda pereaksi FeCl₃ 5%. Baku pembanding yang digunakan asam galat. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna hitam pada sinar UV 254 dan 366 (Kusumo *et al.* 2017).

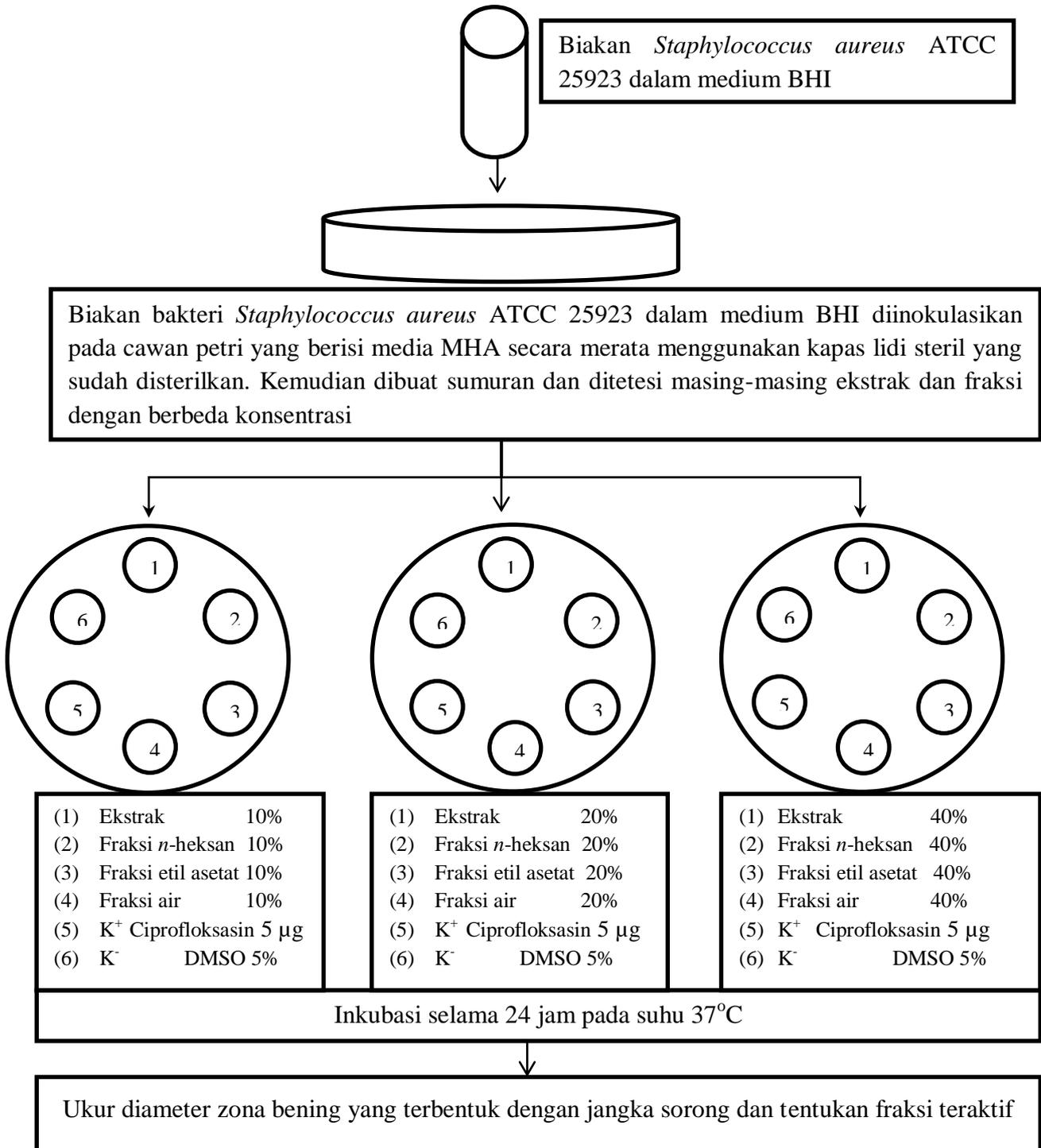
14.5. Identifikasi steroid. Senyawa steroid dapat diidentifikasi dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah kloroform:methanol (9:1), dengan penampak noda pereaksi Liberman-Burchard disertai dengan pemanasan pada suhu 105°C selama 5 menit. Baku pembanding yang digunakan stigmasterol. Reaksi positif steroid ditunjukkan dengan adanya noda berwarna hijau biru (Yuda *et al.* 2017).

E. Analisis Data

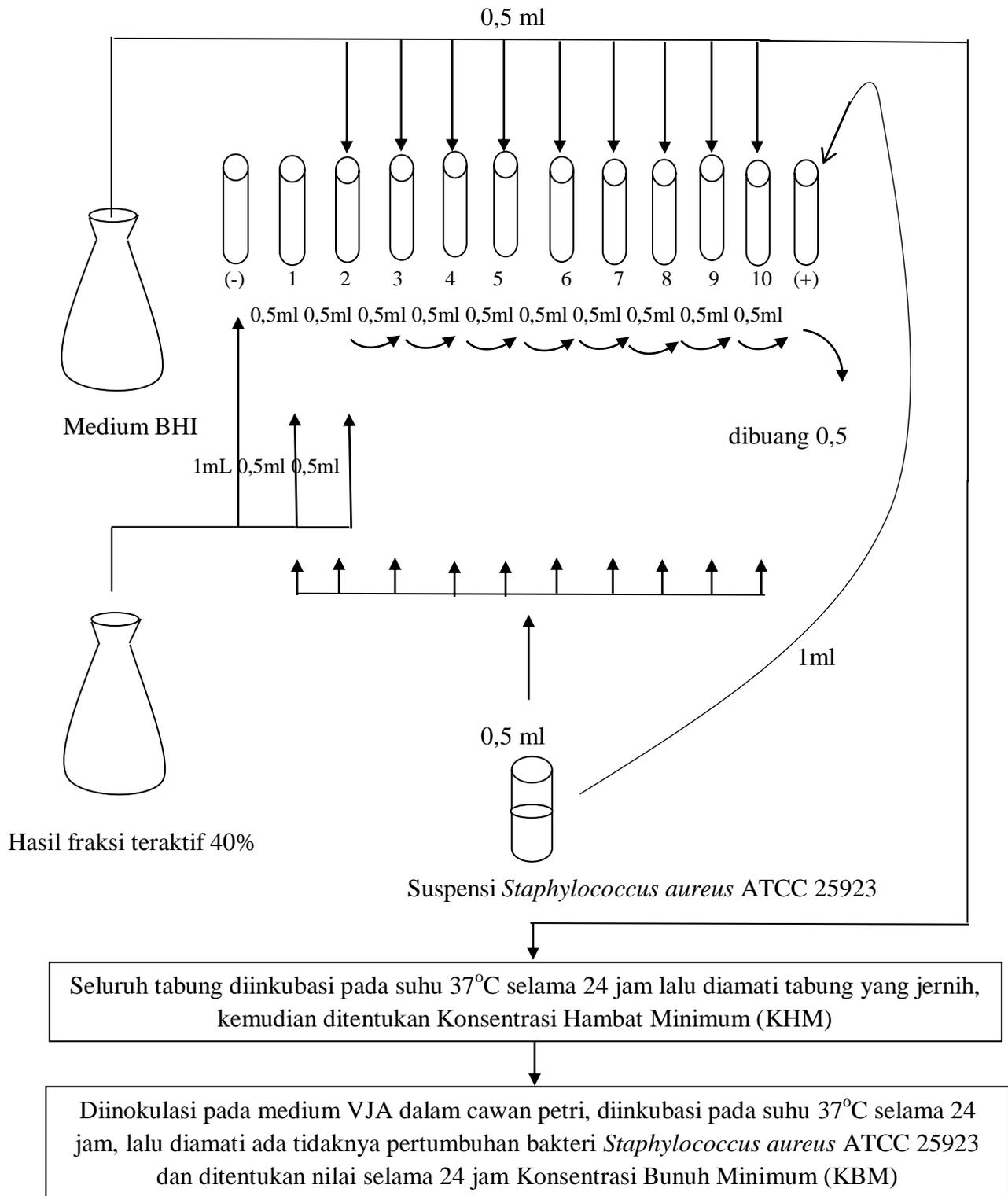
Analisis data aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun kari dengan menggunakan *software* SPSS 17 pada konsentrasi yang sama untuk data hasil uji difusi. Metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilihat apakah data tersebut terdistribusi normal ($p > 0,05$) atau tidak ($p < 0,05$) dengan menggunakan uji distribusi normal (Kolmogorov-Smirnov), jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji parametric (ANOVA).



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol 70% dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dari ekstrak daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng



Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan metode difusi



Gambar 5. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun kari (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan metode dilusi