

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian Tanaman Kari

1. Hasil determinasi tanaman kari

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah identifikasi tanaman kari yang dilakukan di Laboratorium Morfologi Tumbuhan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Berdasarkan hasil determinasi, dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kari yang termasuk dalam famili *Rutacea* dengan nama spesies *Murraya koenigii* (L.) Spreng. Hasil determinasi dan deskripsi lengkap dari tanaman kari dapat dilihat pada lampiran 1.

Tujuan dilakukan determinasi adalah mencocokkan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman yang diteliti, mengetahui kebenaran sampel yang digunakan, menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan, serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain.

2. Hasil pemilihan bahan dan hasil pengeringan daun kari

Daun kari yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kari dalam keadaan segar yang diperoleh dari petani di desa Tinap, Sukomoro, Magetan, Jawa Timur pada bulan Februari 2019. Daun segar yang telah di sortir dari batang kemudian di cuci dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan zat lain yang tidak dibutuhkan. Bobot daun segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah 8000 gram daun murni setelah pensortiran dari 10kg daun beserta batangnya. Serbuk daun kari diperoleh dari daun kari segar yang berwarna hijau dengan bobot basah 8000 gram. Daun kari kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50⁰C sehingga didapatkan bobot kering daun kari sebanyak 1900 gram.

Tabel 1. Hasil rendemen simplisia daun kari

Berat basah (gram)	Berat kering (gram)	Rendemen (%)
8000	1900	23,75

Berdasarkan tabel 1, hasil rendemen simplisia yang diperoleh adalah 23,75%. Hasil perhitungan rendemen simplisia daun kari dapat dilihat pada lampiran 4.

3. Hasil pembuatan serbuk daun kari

Daun kari yang sudah kering kemudian diserbuk dengan menggunakan mesin penggiling. Tujuan dilakukan penyerbukan yaitu untuk memperbesar luas permukaan simplisia sehingga memudahkan simplisia untuk larut dalam zat penyari. Hasil dari penyerbukan simplisia sebanyak 1900 gram. Serbuk yang sudah digiling kemudian diayak dengan menggunakan mesh nomor 40. Tujuan dilakukan pengayakan agar didapatkan ukuran serbuk yang seragam sehingga pelepasan zat aktifnya merata. Hasil pengayakan serbuk yang didapatkan yaitu 1700 gram serbuk halus.

Tabel 2. Hasil rendemen serbuk terhadap berat daun kering

Berat basah (gram)	Berat kering (gram)	Rendemen (%)
1900	1700	89,47

Berdasarkan tabel 2, hasil rendemen serbuk terhadap berat daun kering yang diperoleh adalah 89,47%. Hasil perhitungan rendemen serbuk terhadap berat daun kering dapat dilihat pada lampiran 5.

4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun kari

Penetapan susut pengeringan serbuk daun kari dilakukan dengan alat *moisture balance*. Tujuan dilakukan penetapan susut pengeringan ini adalah untuk memberikan batasan maksimal mengenai besarnya senyawa yang hilang pada saat proses penguapan. Susut pengeringan tidak hanya menggambarkan air yang hilang, tetapi juga senyawa menguap lainnya seperti minyak atsiri.

Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun kari

Replikasi	Penimbangan (gram)	Susut pengeringan (%)
1	2,00	5,0
2	2,00	6,5
3	2,00	6,5
Rata-rata ± SD		6 ± 0,86

Berdasarkan tabel 3, rata-rata hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun kari sebesar $6 \pm 0,86$. Hasil tersebut telah memenuhi syarat dimana susut pengeringan daun kari yang ditetapkan tidak lebih dari 10%, sehingga diharapkan

serbuk daun kari tahan terhadap kerusakan akibat aktivitas mikroba atau jamur jika disimpan dalam waktu yang relatif lama. Hasil replikasi yang tidak sama disebabkan karena kandungan lembab serbuk daun kari yang tidak sama sehingga menyebabkan hasil yang berbeda ketika diuji dengan moisture balance. Hasil perhitungan susut pengeringan serbuk daun kari juga dapat dilihat pada lampiran 6.

5. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun kari

Pembuatan ekstrak etanol daun kari menggunakan bahan serbuk daun kari yang sudah halus dengan menggunakan metode maserasi. Proses maserasi dilakukan selama 5 hari dengan etanol 70%. Pemilihan konsentrasi pelarut etanol 70% dikarenakan etanol 70% lebih bersifat polar dibandingkan dengan pelarut etanol 96% untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat polar. Hasil maserasi diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator*. Ekstrak yang didapatkan dari hasil penguapan *rotary evaporator* belum terlalu pekat, sehingga perlu dipadatkan dengan cara mengoven ekstrak selama beberapa hari hingga didapatkan ekstrak kental.

Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak etanol daun kari

Serbuk daun kari (gram)	Ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
800	125,25	15,65

Berdasarkan tabel 4, hasil rendemen ekstrak etanol daun kari sebesar 15,65%. Hasil perhitungan susut pengeringan serbuk daun kari juga dapat dilihat pada lampiran 7.

6. Hasil penetapan kadar air daun kari

Penetapan kadar air ekstrak daun kari pada penelitian ini menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Tujuan penetapan kadar air untuk mengetahui kandungan air dalam ekstrak yang berguna untuk memperpanjang penyimpanan yang berkaitan dengan kontaminasi mikroorganisme. Toluena digunakan sebagai pelarut karena memiliki titik didih yang lebih tinggi dari air dan tidak bercampur dengan air serta mempunyai berat jenis lebih rendah daripada air (Sudarmadji *et al* 1997).

Tabel 5. Persentase penetapan kadar air ekstrak daun kari

Replikasi	Berat awal (gram)	Volume air (mL)	Kadar (%)
1	20,02	0,5	2,49
2	20,01	0,5	2,49
3	20,01	0,5	2,49

Rata-rata ± SD	20,01	0,5	2,49 ± 0
-----------------------	-------	-----	----------

Berdasarkan tabel 5, hasil persentase rata-rata kadar air dalam ekstrak daun kari adalah 2,49%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa kadar air dalam ekstrak daun kari telah memenuhi syarat, yaitu tidak lebih dari 10% (Depkes RI 2010). Hasil perhitungan persentase rata-rata kadar air serbuk daun kari juga dapat dilihat pada lampiran 8.

7. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun kari

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya kandungan alkohol didalam ekstrak daun kari. Etanol sendiri memiliki aktivitas antibakteri, hal ini dapat mempengaruhi konsentrasi hambat ekstrak etanol daun kari terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Hasil pemeriksaan bebas etanol ekstrak daun kari dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun kari

Esterifikasi ekstrak daun kari	Hasil uji	Pustaka
Ekstrak + H ₂ SO ₄ pekat + CH ₃ COOH, dipanaskan → C ₄ H ₈ O ₂	Tidak tercium bau ester yang khas	Tidak tercium bau ester yang khas

Berdasarkan tabel 6 menunjukkan bahwa ekstrak daun kari sudah bebas dari etanol karena tidak tercium bau ester. Hal ini menandakan bahwa pelarut etanol 70% yang digunakan pada saat ekstraksi telah menguap seluruhnya pada saat pemekatan dengan alat *rotary evaporator*.

8. Hasil penetapan bobot jenis

Penentuan bobot jenis merupakan perbandingan antara bobot zat dengan bobot air yang bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan kimia yang terlarut pada suatu ekstrak dan memberikan batasan tentang besarnya massa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang (Depkes RI 2000). Bobot jenis merupakan sifat fisika dari suatu ekstrak. Dengan mengetahui bobot jenis ekstrak maka kita dapat menentukan apakah suatu zat dapat bercampur atau tidak dengan zat lainnya (Halilah *et al.* 2017). Penentuan bobot jenis ekstrak dilakukan dengan menggunakan piknometer. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak yang telah diencerkan sebesar 5% menggunakan etanol 70% sebagai pelarut.

Tabel 7. Hasil uji bobot jenis ekstrak daun kari

Replikasi	Piknometer kosong (gram)	Piknometer + air (gram)	Piknometer + ekstrak (gram)	Bobot jenis (g/mL)
1	34,06	82,45	80,24	0,95
2	40,14	89,05	86,48	0,95
3	34,23	83,08	79,08	0,92
Rata-rata ± SD			0,94 ± 0,02	

Berdasarkan tabel 7, rata-rata hasil bobot jenis yang diperoleh sebesar 0,94/mL ± 0,02. Dari hasil yang didapatkan bobot jenis ekstrak etanol daun kari <1 maka kontaminasi kecil dan kemungkinan terdapat senyawa yang tidak larut dalam etanol pada saat pengenceran atau proses ekstraksi seperti senyawa steroid. Hasil perhitungan bobot jenis dapat dilihat pada lampiran 11.

9. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun kari

Identifikasi kandungan kimia bertujuan untuk menetapkan golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun kari. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun kari dilakukan dengan menggunakan uji tabung dan kromatografi lapis tipis. Kandungan kimia yang diidentifikasi pada penelitian ini adalah alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan steroid. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun kari dapat dilihat pada tabel 8 dan lampiran 13.

Tabel 8. Hasil identifikasi kandungan kimia daun kari

Kandungan kimia	Pustaka	Hasil	Ket
Alkaloid	Terbentuk endapan putih (Mayer), terbentuk endapan coklat kemerahan (Wagner) dan terbentuk endapan jingga (Dragendorff) (Setyowati <i>et al.</i> 2014)	Terbentuk endapan putih (Mayer) dan endapan jingga (Dragendorff)	+
Flavonoid	Terbentuk warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Noer <i>et al.</i> 2018)	Terbentuk warna kuning pada lapisan amil alkohol	+
Saponin	Terbentuk busa stabil selama kurang dari 10 menit (Illing <i>et al.</i> 2017)	Terbentuk busa setinggi 1,5 cm stabil selama kurang dari 10 menit	+
Tanin	Terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman (Widiastuti <i>et al.</i> 2014)	Terbentuk warna hijau kehitaman	+
Steroid	Terbentuk warna biru atau hijau (steroid) dan warna merah atau ungu (triterpenoid) (Yuda <i>et al.</i> 2017)	Terbentuk warna merah keunguan (Triterpenoid)	+

10. Fraksinasi

Ekstrak kental yang telah diperoleh dari metode maserasi dilakukan fraksinasi dengan menggunakan tiga pelarut, yaitu pelarut nonpolar (*n*-heksana), pelarut semipolar (etil asetat) dan pelarut polar (air).

Tabel 9. Rendemen hasil fraksi *n*-heksana, etil asetat dan fraksi air daun kari

Bobot ekstrak (g)	Fraksi	Bobot Fraksi (g)	Rendemen (%)
50	<i>n</i> -Heksana	1,29	2,59
	Etil asetat	3,29	6,55
	Air	43,93	87,85

Berdasarkan tabel 9 menunjukkan bahwa hasil tiap fraksi berbeda-beda, dimana hasil fraksi air memiliki hasil yang paling besar dibandingkan dengan fraksi *n*-heksan dan etil asetat, artinya daun kari paling banyak memiliki senyawa polar. Fraksi air banyak mengandung senyawa polar berikatan gula (glikosida) (Verawati *et al.* 2019). Hasil rendemen fraksi yang didapat masih jauh dari yang diharapkan yaitu 100%, hal ini mungkin terjadi karena masih ada ekstrak yang menempel diwadiah pada saat proses fraksinasi. Hasil perhitungan rendemen fraksi daun kari dapat dilihat pada lampiran 14.

11. Sterilisasi

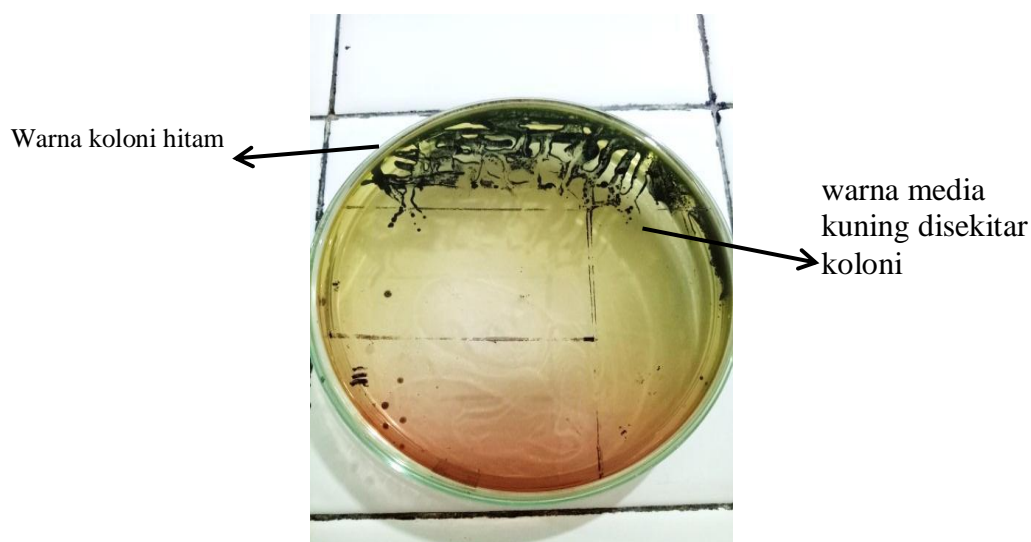
Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Tabung reaksi, gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan oven pada suhu 100°C selama 1 jam. Alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanas api langsung.

12. Hasil pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diambil masing-masing satu atau dua Ose kemudian dimasukkan secara aseptis ke tabung reaksi yang telah steril dan berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian dilihat kekeruhan hasil suspensi bakteri uji yang telah disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Hasil pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada lampiran 16.

13. Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

13.1 Identifikasi bakteri dengan cawan gores. Identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diinokulasi pada medium *Vogel Johnson Agar* (VJA) dalam cawan petri yang berisi 3 tetes kalium telurit 3,5% kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil goresan yang positif ditunjukkan dengan adanya koloni yang berwarna hitam akibat dari kemampuan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mereduksi kalium telurit menjadi metalik telurit sedangkan warna sekitar koloni berwarna kuning akibat dari kemampuan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat memfermentasi manitol menjadi asam yang dideteksi oleh perubahan warna indikator phenol red dari merah menjadi kuning (Jawetz *et al.* 2007).

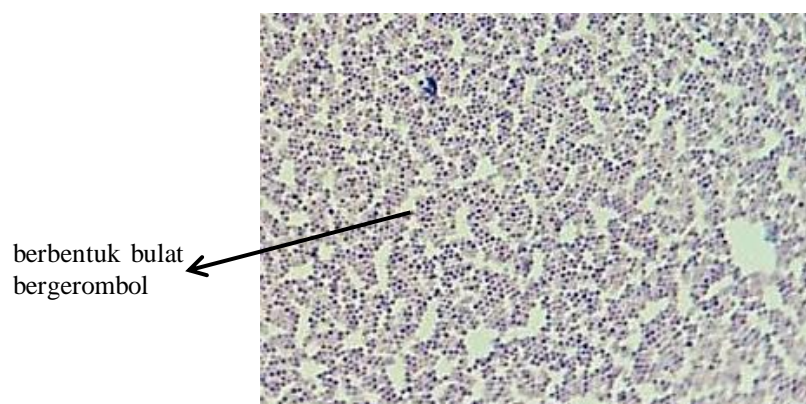


Gambar 6. Identifikasi Koloni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

13.2 Hasil identifikasi mikroskopis pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengamati morfologi sel bakteri dan untuk mengelompokkan bakteri menjadi 2 yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pewarnaan Gram menggunakan 4 jenis reagen, Gram A (kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordan), Gram C (etanol : aseton = 1:1 sebagai peluntur), Gram D (cat safranin sebagai cat lawan/penutup). Prinsip dari metode ini adalah didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri. Bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 termasuk golongan

bakteri Gram positif. Bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diperoleh hasil dengan sel bakteri berwarna ungu, berbentuk bulat bergerombol.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 dapat mempertahankan warna violet dari Gram A (Kristal violet) pada pewarnaan Gram karena memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal daripada Gram negatif. Gram B (lugol iodine sebagai mordan) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya ikatan dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas peningkatan zat warna oleh seluruh bakteri akan berwarna ungu. Gram C (etanol : aseton = 1:1 sebagai peluntur) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya pori-pori pada Gram positif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga pori-pori sel bakteri mengkerut karena bakteri Gram positif memiliki lapisan yang tebal menyebabkan warna didalam sel bakteri terjebak, hal ini menyebabkan sel Gram positif akan tetap menjadi ungu. Gram D (cat safranin sebagai cat lawan/penutup) ditetaskan sehingga sel Gram positif yang awalnya berwarna ungu akan tetap berwarna ungu (Jawetz *et al.* 2007).

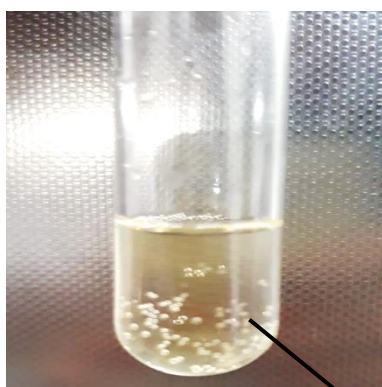


Gambar 7. Identifikasi pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

13.3 Hasil identifikasi secara biokimia. Identifikasi uji biokimia pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 terdiri dari dua uji yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase bertujuan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri uji. Uji katalase digunakan untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, dimana kelompok bakteri *Staphylococcus* bersifat katalase positif. Uji katalase menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya buih atau gelembung udara setelah koloni ditetesi dengan H_2O_2 3% sebab bakteri *Staphylococcus aureus* memproduksi enzim katalase yang dapat memecah

H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . 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 bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim koagulase. Uji koagulase digunakan untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. Uji koagulase menggunakan plasma darah kelinci yang diberikan asam sitrat, diencerkan (1:5) ditambah satu Ose biakan bakteri diinkubasi pada suhu $37^\circ C$. Uji koagulase dinyatakan positif ditandai dengan adanya gumpalan plasma putih tidak lepas dan tetap melekat pada dinding tabung saat dimiringkan (Jawetz *et al.* 2007).



Terdapat gelembung udara



Terdapat Gumpalan putih di dinding

Gambar 8. Identifikasi biokimia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

14. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksinasi daun kari terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi

Hasil dari fraksi *n*-heksana, etil asetat dan fraksi air daun kari dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi untuk mengetahui terbentuk atau tidaknya daerah jernih di sekeliling cakram disk yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan larutan uji terhadap pertumbuhan bakteri pada medium *Muller Hinton Agar* (MHA). Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui mana yang mempunyai daya hambat yang paling baik terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian ini yaitu 40%, 20%, 10%. Kontrol positif yang digunakan yaitu ciprofloksasin dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Perhitungan konsentrasi larutan dapat dilihat pada lampiran 17. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 18.

Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 metode difusi

Sampel	Konsentrasi	Daya Hambat			Rata-rata (mm)	SD
		I	II	III		
Ekstrak	40%	12,5	12	11,5	12	0,5
	20%	10	9	10,5	9,83	0,76
	10%	8	7	8,5	7,83	0,76
Fraksi <i>n</i> -heksana	40%	10	10,75	9	9,92	0,88
	20%	9,75	9	8	8,92	0,88
	10%	8,5	7	8	7,83	0,76
Fraksi etil asetat	40%	18	17	16,5	17,17	0,76
	20%	14,5	14,75	13	14,08	0,95
	10%	11,5	10,75	11	11,08	0,38
Fraksi air	40%	10	9	8	9	1
	20%	8	7,5	9	8,17	0,76
	10%	7	6	7	6,67	0,58
DMSO (Kontrol-)	5%	0	0	0	0	0
Ciprofloksasin (Kontrol +)	5µg	25	25	25	25	0

Berdasarkan hasil tabel diatas dari pengujian aktivitas antibakteri *n*-heksana, etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol daun kari terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan adanya daya hambat dibuktikan dengan adanya daerah disekitar disk yang tidak ditumbuhi bakteri, dari tabel diatas menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai daya hambat paling besar terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 karena fraksi etil asetat mampu menarik semua senyawa kandungan kimia pada daun kari bersifat semipolar. Perbedaan diameter hambat dikarenakan senyawa yang terdapat dalam ekstrak berbeda-beda tergantung tingkat kepolaran dari fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air. Pada DMSO 5% tidak ada pertumbuhan bakteri karena DMSO 5% digunakan sebagai emulgator (sebagai kontrol negatif), sehingga tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri artinya, DMSO 5% tersebut tidak memiliki zona hambat pada media tersebut. Fraksi etil asetat memiliki zona hambat yang termasuk dalam kategori sedang (16-20 mm). Kontrol positif (ciprofloksasin) termasuk dalam kategori kuat (>20 mm) karena kontrol positif merupakan suatu

bahan kimia yang telah terbukti dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri.

Analisis data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi menggunakan statistik *one way* ANOVA. *One way* ANOVA digunakan untuk membandingkan ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun kari pada tiap konsentrasi yaitu: 40%, 20% dan 10%. Kontrol positif dan kontrol negatif diikutsertakan dalam analisis *oneway* ANOVA. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara fraksi *n*-heksana, etil asetat, air, ekstrak etanol dan kontrol positif untuk mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji *One-Sampel Kolmogorove-Smirnov* diperoleh signifikan $0,179 > 0,05$ maka H_0 diterima, data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji ANOVA. Hasil uji homogenitas sebesar $0,246 > 0,05$ yang menandakan bahwa data sudah homogen. Hasil uji *oneway* ANOVA tabel diameter hambat diperoleh $F = 191,684$ dengan probabilitas $0,000 < 0,05$ yang berarti dari tiap sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Berdasarkan tabel Tukey terdapat tanda * pada *Mean Difference*, tanda tersebut menunjukkan bahwa perbedaan diameter hambat aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Apabila tidak terdapat tanda * maka diameter hambat aktivitas antibakteri tidak signifikan artinya tidak memiliki perbedaan. Hasil analisis Tukey test dapat dilihat pada lampiran 23. Tabel *Homogeneous Subsets* bertujuan untuk mengetahui mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* terbagi menjadi 8 subset, dimana hasil yang didapatkan semakin ke kanan semakin besar daya hambatnya. Berbeda dengan sampel yang termasuk dalam satu subset tidak mempunyai perbedaan secara signifikan dalam menghambat aktivitas antibakteri. Tabel *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada lampiran 23.

Berdasarkan tabel 10 dan analisis data maka dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi yang efektif dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan mempunyai aktivitas terbesar

dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana, fraksi air dan ekstrak etanol daun kari. Zona hambat yang dihasilkan oleh fraksi etil asetat lebih besar dari zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak. Hal tersebut dapat dikarenakan ekstrak masih mengandung banyak senyawa dan lebih pekat sehingga ekstrak sulit berdifusi ke dalam media yang dapat berpengaruh pada aktivitas antibakteri. Pada penelitian ini fraksi *n*-heksana mampu memberikan zona hambat karena fraksi *n*-heksana bersifat non polar dan dapat menarik senyawa steroid/triterpenoid yang memiliki aktivitas antibakteri. Fraksi etil asetat mampu menarik semua senyawa semi polar seperti alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin. Senyawa alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri karena dapat mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Kurniawan dan Aryana 2015). Senyawa flavonoid mengandung senyawa fenol yang memiliki kemampuan untuk mendenaturasi protein dan merusak dinding sel bakteri (Kurniawan dan Aryana 2015). Senyawa tanin bekerja dengan target pada dinding polipeptida dinding sel bakteri sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna dan kemudian sel bakteri akan mati (Sapara *et al.* 2016). Senyawa saponin dapat menekan pertumbuhan bakteri, karena senyawa tersebut dapat menurunkan tegangan permukaan dinding sel dan apabila berinteraksi dengan dinding sel bakteri maka dinding sel tersebut akan lisis (Karlina *et al.* 2013).

15. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat daun kari dengan metode dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilanjutkan dengan menggunakan metode dilusi dari fraksi teraktif daun kari yaitu fraksi etil asetat dalam menghambat aktivitas antibakteri yang diperoleh dari hasil uji difusi. Uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun kari terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan dengan metode dilusi untuk mengetahui nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). Pengujian dilakukan dengan konsentrasi larutan fraksi etil asetat masing-masing adalah 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,3125%; 0,15625%; 0,078125%; kontrol negatif (fraksi teraktif dari daun kari tanpa penambahan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) kontrol positif (suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat dilihat dari kejernihan tabung reaksi yang menunjukkan bahwa pada tabung tersebut dapat menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kemudian dari semua tabung tersebut dilakukan inokulasi bakteri pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA). Inokulasi dari tabung pada medium agar dalam cawan petri perlu dilakukan sehingga diketahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) sulit diamati karena fraksi uji yang berwarna sehingga sulit dibedakan antara keruh dan jernih, sehingga perlu dilakukan goresan pada media selektif yaitu VJA (*Vogel Johnson Agar*) untuk mengisolasi bakteri gram positif berdasarkan kemampuan memfermentasi laktosa atau tidak. Tujuannya agar terlihat Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada fraksi yang diuji. Metode dilusi untuk mengetahui dosis minimal dari fraksi yang bersifat antibakteri. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan menginokulasi fraksi dari tabung uji dalam cawan petri steril. Hasil perhitungan pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi dapat dilihat pada tabel 11 dan lampiran 19.

Tabel 11. Hasil aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari ekstrak daun kari terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 metode dilusi

Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat 40%		
	I	II	III
Kontrol (-)	-	-	-
40%	-	-	-
20%	-	-	-
10%	-	-	-
5%	-	-	-
2,5%	+	+	+
1,25%	+	+	+
0,625%	+	+	+
0,3125%	+	+	+
0,15625%	+	+	+
0,078125%	+	+	+
Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan

(+): ada pertumbuhan bakteri

(-): tidak ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-): fraksi etil

Kontrol (+): suspensi bakteri

Berdasarkan tabel 11 diatas menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dapat membunuh pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan Konsentrasi Bunuh Minimum 5%. Subkultur media VJA pada konsentrasi 40%,

20%, 10% dan 5% tidak ditumbuhi oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dengan warna bakteri kehitaman. Disimpulkan konsentrasi tersebut efektif untuk membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Hasil uji dilusi fraksi teraktif (etil asetat 40%) dapat dilihat pada lampiran 20.

Fraksi etil asetat konsentrasi 40% adalah fraksi yang paling efektif. Hasil tersebut disebabkan oleh adanya kandungan senyawa semipolar di fraksi etil asetat yang lebih optimum dibandingkan senyawa didalam ekstrak, fraksi *n*-heksana dan fraksi air daun kari. Aktivitas antibakteri yang efektif dari fraksi etil asetat daun kari adalah alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin.

16. Hasil identifikasi fraksi paling aktif secara KLT

Identifikasi kandungan kimia dengan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan pada fraksi etil asetat karena fraksi ini mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui beberapa senyawa antibakteri yang terkandung pada fraksi etil asetat. Hasil identifikasi fraksi paling aktif secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat dilihat pada lampiran 21.

16.1. Hasil identifikasi senyawa alkaloid secara KLT. Hasil identifikasi senyawa alkaloid menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak etil asetat : metanol : air (4:5:1). Baku pembanding yang digunakan papaverin dengan pereaksi semprot Dragendrof. Hasil identifikasi golongan senyawa alkaloid dapat dilihat pada tabel 12.

Tabel 12. Hasil identifikasi kandungan senyawa alkaloid dengan metode KLT

Sampel	Rf	Visual	Visual pereaksi semprot	UV 254 nm	UV 366 nm
Baku	0,84	Tidak berwarna	Jingga	Kuning	Merah tua
Sampel	0,82	Kuning kecoklatan	Jingga	Kuning	Merah tua
	0,92	Kecoklatan	Kecoklatan	Hitam	Hitam

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa alkaloid pada UV 254 nm menimbulkan peredaman. Pada UV 366 berflouresensi ungu dan sinar tampak setelah disemprotkan dragendrof berwarna jingga. Nilai Rf sampel fraksi etil asetat senyawa alkaloid sebesar 0,82 dan nilai Rf standar baku senyawa papaverin sebesar 0,84. Disimpulkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa

alkaloid. Hasil identifikasi golongan senyawa alkaloid dan perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 21.

16.2. Identifikasi senyawa flavonoid secara KLT. Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak butanol : asam glisial : air (4:1:5). Baku pembanding yang digunakan rutin dengan pereaksi semprot Sitoborat. Hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid dapat dilihat pada tabel 13.

Tabel 13. Hasil identifikasi kandungan senyawa flavonoid dengan metode KLT

Sampel	Rf	Visual	Visual pereaksi semprot	UV 254 nm	UV 366 nm
Baku	0,46	Kuning	Kuning	Hijau	Biru
Sampel	0,5	Kuning	Kuning	Hijau	Biru
	0,96	Hijau	Hijau	Hijau tua	Merah tua

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa flavonoid pada UV 254 nm menimbulkan peredaman. Pada UV 366 berflouresensi biru dan sinar tampak setelah disemprotkan sitoborat berwarna kuning. Nilai Rf sampel fraksi etil asetat senyawa flavonoid sebesar 0,5 dan nilai Rf standar baku senyawa kuersetin sebesar 0,46. Disimpulkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa flavonoid. Hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid dan perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 21.

16.3. Identifikasi senyawa saponin secara KLT. Identifikasi senyawa saponin menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : metanol : air (13 : 7 : 2). Baku pembanding yang digunakan gliserisin dengan pereaksi semprot Liberman-Burchard. Hasil identifikasi golongan senyawa saponin dapat dilihat pada tabel 14.

Tabel 14. Hasil identifikasi kandungan senyawa saponin dengan metode KLT

Sampel	Rf	Visual	Visual pereaksi semprot	UV 254 nm	UV 366 nm
Baku	0,7	Tidak berwarna	Tidak berwarna	Ungu	Tidak berwarna
Sampel	0,7	Kecoklatan	Kuning kecoklatan	Ungu	Tidak Berwarna

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa saponin pada UV 254 nm menimbulkan peredaman. Pada UV 366 bercak tidak berflouresensi dan sinar tampak setelah disemprotkan Liberman-Burchard adanya bercak berwarna coklat.

Nilai Rf sampel fraksi etil asetat senyawa saponin sebesar 0,7 dan nilai Rf standar baku senyawa gliserisin sebesar 0,7. Disimpulkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa saponin. Hasil identifikasi golongan senyawa saponin dan perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 21.

16.4. Identifikasi senyawa tanin secara KLT. Identifikasi senyawa tanin menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (6 : 4). Baku pembanding yang digunakan asam galat dengan pereaksi semprot FeCl₃. Hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid dapat dilihat pada tabel 15.

Tabel 15. Hasil identifikasi kandungan senyawa tanin dengan metode KLT

Sampel	Rf	Visual	Visual pereaksi semprot	UV 254 nm	UV 366 nm
Baku	0,8	Kecoklatan	Hitam	Hitam	Hitam
Sampel	0,8	Kecoklatan	Hitam	Hitam	Hitam

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa tanin pada UV 254 nm menimbulkan peredaman. Pada UV 366 berflouresensi hitam dan sinar tampak setelah disemprotkan FeCl₃ berwarna hitam. Nilai Rf sampel fraksi etil asetat senyawa tanin sebesar 0,8 dan nilai Rf standar baku senyawa asam galat sebesar 0,8. Disimpulkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa tanin. Hasil identifikasi golongan senyawa tanin dan perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 21.

16.5. Identifikasi senyawa steroid secara KLT. Identifikasi senyawa steroid menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : metanol (9 : 1). Baku pembanding yang digunakan stigmasterol dengan pereaksi semprot Liberman-Burchard. Hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid dapat dilihat pada tabel 16.

Tabel 16. Hasil identifikasi kandungan senyawa steroid dengan metode KLT

Sampel	Rf	Visual	Visual pereaksi semprot	UV 254 nm	UV 366 nm
Baku	0,72	Tidak berwarna	Ungu	Biru	Hijau
Sampel	0,88	Kuning kehijauan	Hijau kebiruan	Hijau	Merah tua
	0,94	Kuning kehijauan	Hijau tua	Hijau tua	Merah gelap

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa steroid pada UV 254 nm menimbulkan peredaman. Pada UV 366 berflouresensi merah kunguan dan sinar

tampak setelah disemprotkan Liberman-Burchard adanya bercak berwarna hijau tua. Nilai Rf sampel fraksi etil asetat senyawa steroid sebesar 0,88 dan nilai Rf standar baku senyawa stigmasterol sebesar 0,72. Nilai Rf antara sampel fraksi etil asetat senyawa steroid dan Rf standar baku pembanding menunjukkan nilai yang jauh berbeda. Disimpulkan bahwa fraksi etil asetat negatif mengandung senyawa steroid. Hasil identifikasi golongan senyawa steroid dan perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 21.