

## **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 yang diperoleh dari Taman Wisata Mekarsari, Bogor, Jawa Barat.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun karandas yang masih segar, berwarna hijau, bersih, dan bebas hama. Daun diambil secara acak dari pangkal sampai ujung daun, tidak teralu muda, dan tidak teralu 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*-heksana, kloroform, dan air dari daun karandas.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air dari ekstrak etanol 70% daun karandas terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

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

**2.1. Variabel bebas** dalam penelitian ini adalah variabel yang dapat diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun karandas dengan berbagai konsentrasi

**2.2. Variabel tergantung** adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan

bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang terpengaruh oleh fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun karandas dilihat dari pertumbuhan bakteri tersebut pada media uji.

**2.3. Variabel terkontrol** adalah variabel yang dianggap mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kondisi laboratorium meliputi kondisi inkas, alat, bahan, dan media yang digunakan harus steril, serta suhu dan waktu inkubasi harus terkontrol.

### 3. Definisi operasional variabel utama

**Pertama**, daun karandas yang diambil adalah daun segar, bebas hama dan tidak terlalu muda atau terlalu tua yang diperoleh dari Taman Wisata Mekarsari, Bogor, Jawa Barat yang diambil pada bulan Januari 2019.

**Kedua**, serbuk daun karandas adalah daun karandas yang diambil, dicuci dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C, kemudian diserbuk sampai halus dengan menggunakan ayakan nomor 40.

**Ketiga**, ekstrak etanol daun karandas adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% yang kemudian dipekatkan.

**Keempat**, fraksi *n*-heksana daun karandas adalah hasil fraksinasi dari ekstrak etanol daun karandas menggunakan pelarut *n*-heksana.

**Kelima**, fraksi kloroform daun karandas adalah hasil fraksinasi dari residu *n*-heksana dengan menggunakan pelarut kloroform.

**Keenam**, fraksi air daun karandas adalah residu hasil proses fraksinasi dengan kloroform yang selanjutnya dipekatkan dalam *waterbath* hingga kental.

**Ketujuh**, bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

**Kedelapan**, metode difusi adalah metode uji aktivitas antibakteri untuk menskrining aktivitas antibakteri yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat (bening) pada media sehingga dapat diketahui fraksi teraktifnya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi

kloroform, dan fraksi air yaitu dengan cakram disk. Kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif adalah siprofloksasin 5 µg/disk.

**Kesembilan**, metode dilusi adalah metode uji 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. Metode ini menggunakan satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,195%. Kontrol positif adalah suspensi bakteri dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI). Kontrol negatif adalah konsentrasi fraksi teraktif daun karandas. Kontrol positif akan menunjukkan keberadaan bakteri dan kontrol negatif akan menunjukkan ketidakberadaan bakteri.

### C. Bahan dan Alat

#### 1. Bahan

**1.1. Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan adalah daun karandas yang diperoleh dari Taman Wisata Mekarsari, Bogor, Jawa Barat.

**1.2. Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan antara lain pelarut etanol 70%, pelarut *n*-heksana, kloroform, aquadest, spiritus, kalium tellurite 3,5%, larutan standar MC Farland 0,5, DMSO 5%, FeCl<sub>3</sub>, HCl, asam sulfat, asam sitrat, Dragendroff, Mayer, sitroborat, Lieberman Burchard, serbuk Mg, kuersetin, asam galat, stigmasterol, kristal violet (Gram A), *lugol iodine* (Gram B), alkohol/aseton (Gram C), safranin (Gram D), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, plasma darah kelinci dan obat perbandingan yang digunakan adalah antibiotik siprofloksasin 5 µg/disk.

**1.3. Bakteri Uji.** Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**1.4. Medium.** Media yang digunakan dalam penelitian adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Muller Hinton Agar* (MHA), *Vogel Johnson Agar* (VJA).

#### 2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat maserasi berupa botol mulut lebar warna coklat, mesin penggiling untuk membuat serbuk, lempeng

KLT, gelas ukur, spirtus, penggaris, kaca objek, kertas saring, kaki tiga, corong penyaring, corong pisah, selang, timbangan analitik, *rotary evaporator*, batang pengaduk, erlenmayer, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, bunsen, inkas, vial, rak tabung, labu alas bulat, *moisture balance*, mikroskop, pipet ukur, *Sterling Bidwell*, *moisture balance*, inkubator, autoklaf.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman**

Tahap pertama penelitian ini adalah melakukan deskripsi dan determinasi tanaman daun karandas. Determinasi tanaman bertujuan untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi daun karandas baik secara mikroskopis maupun makroskopis terhadap kepustakaan yang dibuktikan di Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret.

### **2. Pengumpulan bahan**

Daun karandas yang segar, bersih, dan bebas hama dan sudah diambil dari Taman Wisata Mekarsari, Bogor, Jawa Barat. Daun diambil secara acak dari pangkal sampai ujung daun, tidak teralu muda, dan tidak teralu tua.

### **3. Pengeringan dan pembuatan serbuk**

Daun karandas yang segar dibersihkan dan dan dicuci terlebih dahulu dengan air bersih, lalu bahan diletakkan pada loyang alumunium dan dikeringkan di dalam oven 50<sup>0</sup>C selama 4-5 hari. Pengeringan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga dapat mencegah pertumbuhan mikroorganisme dan perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu serta mempermudah proses penyerbukkan. Daun karandas yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling lalu diblender dan diayak dengan ayakan nomor 40, sehingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan relatif homogen. Tujuan pembuatan serbuk daun karandas adalah untuk memperluas permukaan partikel bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung efektif.

### **4. Penetapan kadar air serbuk daun karandas**

Penetapan kadar air serbuk daun karandas dilakukan dengan alat *Sterling Bidwell*. Metode ini dilakukan dengan cara menimbang serbuk daun karandas 20

gram dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan toluen jenuh air kurang lebih 200 mL sampai semua serbuk terendam. Setelah alat *Sterling Bidwell* selesai dipasang, panaskan labu dengan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan 2 tetes tiap detik kemudian naikkan hingga 4 tetes tiap detik. Pemanasan dihentikan jika pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (Depkes 2013).

### 5. Pembuatan ekstrak etanolik daun karandas

Pembuatan ekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Serbuk daun karandas sebanyak 700 gram dimasukkan ke dalam botol cokelat bermulut lebar, dengan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 7000 mL. Direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Dipisahkan maserat dengan cara disaring menggunakan kain flanel. Proses penyarian diulangi sebanyak satu kali menggunakan pelarut etanol 70% dengan jumlah volume pelarut sebanyak 3500 mL. Kumpulkan semua maserat kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak pekat (Depkes 2013). Selanjutnya dilakukan pengukuran rendemen ekstrak dengan rumus :

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

### 6. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun karandas

Penetapan susut pengeringan ekstrak daun karandas menggunakan alat *moisture balance*. Suhu *moisture balance* diatur yaitu sebesar 105°C dan waktu pengeringan secara manual hingga kering. Dimasukkan neraca timbang dengan posisi 0,00 kemudian ditimbang 2 gram ekstrak daun karandas. Kadar lembab tidak boleh lebih dari 10% (Depkes 2000).

### 7. Uji bebas etanol ekstrak daun karandas

Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan metode uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat dan asam sulfat pekat lalu dipanaskan, dikatakan positif bebas etanol jika tidak tercium bau ester yang khas dari etanol.

Tujuan dilakukannya uji bebas etanol untuk memastikan ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri.

## 8. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang 10 gram ekstrak etanol daun karandas kemudian dilarutkan dengan pelarut air 75 mL, difraksi dengan pelarut *n*-heksana masing-masing 75 mL sebanyak 3 kali. Pada fraksinasi dengan corong pisah, fase *n*-heksana terletak di atas dan fase air terletak di bawah. Fraksi *n*-heksana yang didapat diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Residu sisa fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana difraksinasi 3 kali dengan pelarut kloroform masing-masing 75 mL. Hasil yang didapat adalah fraksi kloroform yang terletak di bawah dan fase air yang terletak di atas, kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, sedangkan fraksi air dipekatkan di atas *waterbath* lalu ditimbang.

## 9. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun karandas

Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun karandas dilakukan terhadap senyawa flavonoid, saponin, triterpenoid, alkaloid, dan tanin dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

**9.1. Flavonoid.** Ekstrak/serbuk sebanyak  $\pm 0,5$  gram dicampurkan dengan aquadestilata kemudian dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat ditambahkan serbuk magnesium, 5 mL HCl pekat, dan amil alkohol ke dalam larutan. Dicampur dan dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Ekstrak dikatakan positif mengandung senyawa flavonoid apabila terbentuk larutan berwarna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Ismiyarto 2009).

**9.2. Saponin.** Ekstrak/serbuk sebanyak  $\pm 0,5$  gram dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah 10 mL aquadest kemudian dikocok kuat selama 10 detik dan ditambahkan 1 tetes larutan asam klorida 2N. Tabung reaksi tersebut didiamkan dan diperhatikan terbentuknya buih selama kurang lebih 10 menit setinggi 1-10 cm. Busa yang stabil menandakan adanya kandungan saponin (Ismiyarto 2009).

**9.3. Tanin.** Ekstrak/serbuk sebanyak  $\pm 0,5$  gram dididihkan dalam 2 mL air lalu disaring. Filtrat ditambahkan FeCl<sub>3</sub> 1% lalu divortex hingga mengalami

perubahan warna. Sampel dinyatakan positif mengandung tanin apabila mengalami perubahan warna biru atau hijau kehitaman (Robinson 1995).

**9.4. Alkaloid.** Ekstrak/serbuk sebanyak  $\pm 0,5$  gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 5 mL HCl 2N. Larutan yang didapat lalu dibagi menjadi 3 tabung reaksi. Tabung pertama berisi blanko, tabung kedua ditambah pereaksi Dragendroff sebanyak 3 tetes dan tabung ketiga ditambah pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Ismiyarto 2009).

**9.5. Steroid/triterpenoid.** Ekstrak/serbuk sebanyak  $\pm 0,5$  gram dilarutkan dalam  $\pm 0,5$  mL kloroform, ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrida. Campuran ini ditetesi 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya warna biru atau hijau menandakan adanya steroid. Bila terbentuk cincin coklat, violet atau merah menandakan adanya triterpenoid (Ismiyarto 2009).

## 10. Sterilisasi

Media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf (uap air jenuh bertekanan tinggi) pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Alat-alat seperti gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan oven pada suhu  $160^{\circ}\text{C}$ - $180^{\circ}\text{C}$  selama 1-2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung dan inkas disterilisasi menggunakan formalin cair (Waluyo 2004).

## 11. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

**11.1. Identifikasi makroskopis.** Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasikan pada medium *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang ditambah kalium tellurit 3,5% kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Apabila koloni yang dihasilkan berwarna hitam dan warna medium di sekitar menjadi berwarna kuning maka dinyatakan positif bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Supartono 2006).

**11.2. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat apusan di atas objek glass yang telah difiksasi kemudian ditetesi pewarna Gram A yang berisi kristal violet selama 1 menit, lalu dicuci dengan aquadest mengalir kemudian ditetesi dengan pewarna

Gram B yang berisi *lugol iodine* sebagai mordant selama 1 menit kemudian dicuci lagi dengan aquadest mengalir dan dikering anginkan. Preparat ditetesi dengan Gram C yang berisi alkohol/aseton sebagai peluntur dan didiamkan selama  $\pm$  45 detik, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian preparat dikeringkan. Terakhir preparat ditetesi Gram D yang berisi safranin tunggu kurang lebih 1 menit dicuci dengan aquadest mengalir kemudian dikeringkan dengan kertas tissue yang ditempelkan disisi ulasan lalu didiamkan hingga kering, diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dinyatakan Gram positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati di bawah mikroskop (Supartono 2006).

**11.3. Uji katalase.** Pada uji katalase digunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada medium BHI kemudian ditambahkan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara sebab *Staphylococcus aureus* mempunyai enzim katalase. Penambahan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% akan terurai menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub>. (Jawetz *et al.* 2012).

**11.4. Uji koagulase.** Koagulase adalah enzim yang dapat mengubah fibrinogen menjadi fibrin dan mampu mengumpulkan plasma. Pada uji koagulase digunakan plasma darah kelinci yang telah diberi asam sitrat, kemudian ditambahkan beberapa tetes suspensi bakteri uji, lalu diinkubasi pada suhu 37°C. Tabung-tabung diperiksa dengan melihat pembentukan gumpalan plasma selama 1-4 jam. Hasilnya positif kuat jika tabung tes dibalik, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung (Jawetz *et al.* 2012).

## **12. Pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dari suatu biakan murni pada media *Nutrient Agar* (NA) diambil kurang lebih 2 jarum ose bakteri dan dibuat suspensi dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infussion* (BHI) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Amati kekeruhannya dan disesuaikan dengan 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 menggantikan perhitungan bakteri satu persatu (Bonang *et al.* 2002).

### **13. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi air daun karandas**

**13.1. Metode difusi.** Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi bertujuan untuk skrining aktivitas antibakteri dari fraksi-fraksi dan ekstrak daun karandas dilihat dari besarnya zona hambat terhadap bakteri uji sehingga dapat diketahui fraksi teraktifnya. Fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun karandas masing-masing dibuat pada tiga konsentrasi 50%; 25%; 12,5%. Metode difusi menggunakan 3 cawan petri steril yang telah diisi dengan media *Muller Hinton Agar* (MHA) sebanyak 50 mL. Secara aseptis pada cawan petri diinokulasikan suspensi bakteri menggunakan kapas lidi steril secara *spread plate* (harus merata diseluruh permukaan media) dan medium diamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media.

Uji ini menggunakan metode cakram disk. Cakram disk berukuran 6 mm ditetaskan masing-masing dengan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi air pada 3 konsentrasi, serta larutan DMSO 5% sebagai kontrol negatif dan larutan siprofloksasin 5 µg/disk sebagai kontrol positif. Dibuat tiga kali replikasi pada setiap konsentrasi. Cawan petri diinkubasi suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam, setelah itu diamati hasilnya kemudian diukur zona hambat disekitar cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang jernih (bening) menunjukkan bahwa kandungan senyawa kimia daun karandas memiliki daya hambat terhadap bakteri tersebut.

**13.2. Metode dilusi.** Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi bertujuan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi dilakukan dengan menggunakan 10 tabung steril. Masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa seri konsentrasi yang berbeda yaitu 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,195%, kontrol positif dan kontrol negatif.

Kontrol negatif (tabung 1) berisi 1 mL fraksi teraktif daun karandas dengan konsentrasi 50% dan kontrol positif (tabung 10) berisi 1 mL suspensi bakteri. Masukkan masing-masing 0,5 mL media BHI (larutan pengencer) dan fraksi teraktif daun karandas pada konsentrasi 25% (tabung 2), 12,5% (tabung 3), 6,25%

(tabung 4), 3,12% (tabung 5), 1,56% (tabung 6), 0,78% (tabung 7), 0,39% (tabung 8), 0,195% (tabung 9). Konsentrasi fraksi teraktif tersebut didapatkan melalui pengenceran bertingkat yaitu tabung kedua yang telah berisi BHI 0,5 mL ditambah 0,5 mL larutan stok fraksi teraktif lalu dihomogenkan dengan vortex, dari tabung kedua diambil 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung ketiga yang telah berisi BHI 0,5 mL lalu dihomogenkan dengan vortex, kemudian dari tabung ketiga diambil 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung keempat yang telah berisi BHI 0,5 mL lalu dihomogenkan dengan vortex dan begitu seterusnya sampai tabung kesembilan dan dari tabung kesembilan dibuang 0,5 mL. Suspensi bakteri sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam 8 tabung reaksi yang telah berisi fraksi teraktif pada konsentrasi 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,195%. Kontrol positif akan menunjukkan keberadaan bakteri dan kontrol negatif akan menunjukkan ketidakberadaan bakteri. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, lalu diamati kekeruhannya.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan cara melihat konsentrasi terendah fraksi teraktif pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih, sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media VJA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam-48 jam. Amati ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media VJA. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media 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. Fraksi yang paling aktif diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi yang dinyatakan paling aktif ditotolkan dengan pipa kapiler di atas lempeng KLT, setelah totolan kering, lempeng KLT dimasukkan chamber yang sudah jenuh oleh fase gerak, biarkan beberapa saat hingga fase gerak mengelusi lempeng KLT secara sempurna, dilanjutkan dengan pengeringan lempeng KLT, kemudian dilakukan deteksi sinar

UV 254 dan 366 nm serta diberikan pereaksi semprot yang sesuai. Bercak yang dideteksi ditentukan harga Rf dan penampakan warnanya.

**14.1. Identifikasi flavonoid.** Senyawa flavonoid dapat diidentifikasi dengan KLT, fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak yang digunakan yaitu *n*-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) dan kuarsetin sebagai baku pembanding dengan pereaksi penampak adalah sitroborat. Flavonoid akan berfluoresensi pada sinar UV<sub>366</sub> nm dan di bawah UV<sub>254</sub> nm mengalami peredaman. Hasil positif jika terbentuk fluoresensi kuning, biru, dan ungu pada UV<sub>366</sub> dan terlihat kuning tanpa pereaksi (Koirewoa *et al.* 2012).

**14.2. Identifikasi alkaloid.** Senyawa alkaloid dapat diidentifikasi dengan KLT, fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak yang digunakan yaitu kloroform : etanol (94 : 4). Positif alkaloid ditandai dengan adanya warna coklat jingga sampai merah tua pada bercak setelah disemprot dengan pereaksi Dragendrof. Penampakan bercak berwarna jingga pada UV<sub>254</sub> nm, berwarna kuning atau biru pada UV<sub>366</sub> nm, dan ungu atau biru kehijauan tanpa pereaksi (Budiman *et al.* 2010).

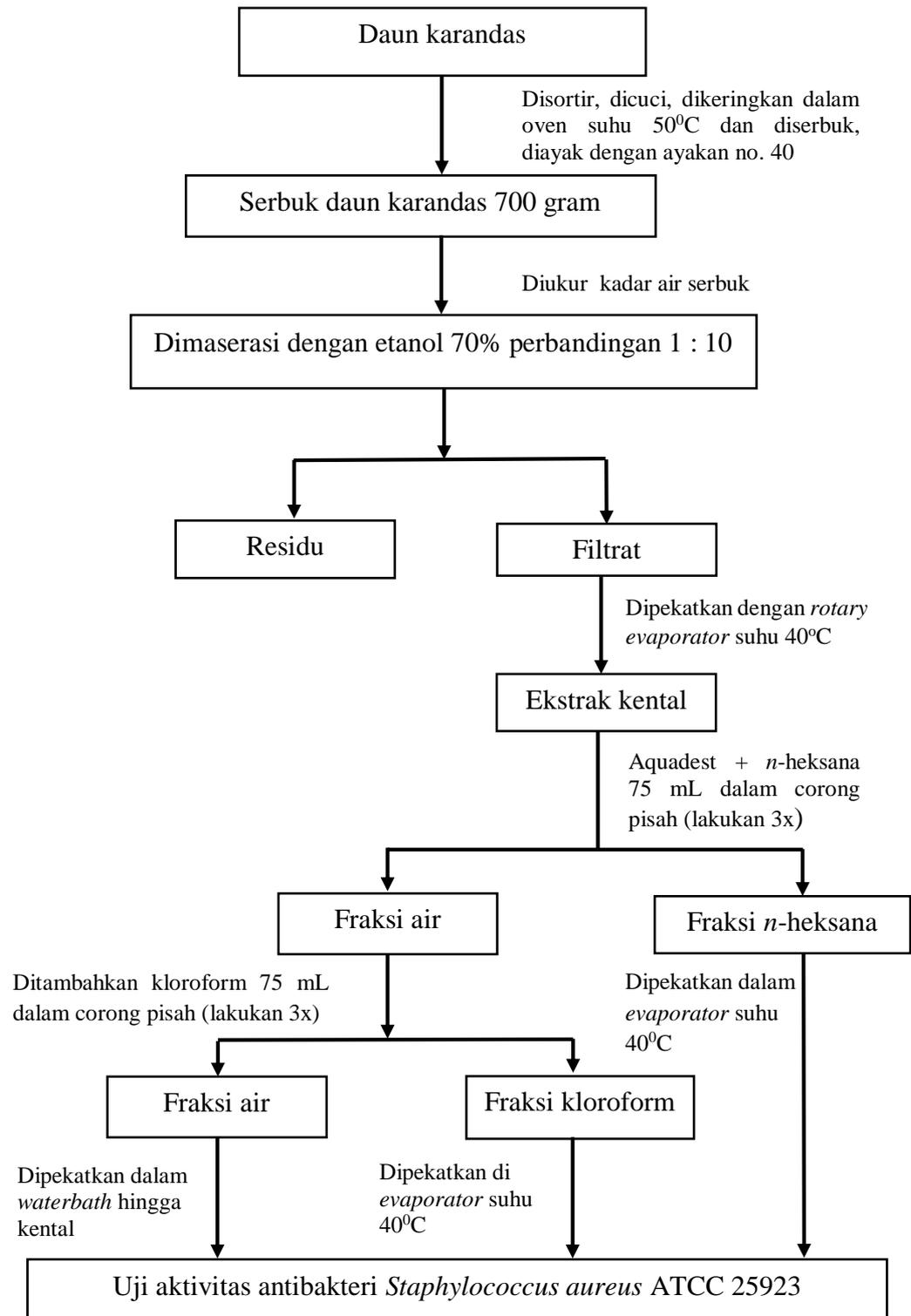
**14.3. Identifikasi tanin.** Senyawa tanin dapat diidentifikasi dengan KLT, fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak yang digunakan yaitu butanol : asam asetat : air (3 : 1 : 1) dan baku pembanding yang digunakan adalah asam galat. Senyawa tanin dideteksi di bawah UV<sub>254</sub> berwarna hijau gelap dan di bawah UV<sub>366</sub> ungu kehitaman dan menggunakan pereaksi FeCl<sub>3</sub> 1% berwarna hitam (Nuria *et al.* 2009).

**14.4. Identifikasi steroid dan triterpenoid.** Senyawa steroid dan triterpenoid dapat diidentifikasi dengan KLT, fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak yang digunakan yaitu heksana : etil asetat (1 : 1) atau CHCl<sub>3</sub> : metanol (10 : 1) dengan pereaksi Lieberman Burchard akan memberikan noda berwarna ungu atau hijau biru yang menandakan sampel mengandung triterpenoid bebas atau steroid. Asam betulinat, asam oleanolat dan asam ursolat memerlukan pengembang khusus seperti eter minyak bumi (titik didih 100-130°C) : dikloroetilena : asam asetat (50 : 50 : 0,7) (Harborne 1987). Stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol dapat diidentifikasi dengan KLT menggunakan fase gerak toluen : etil

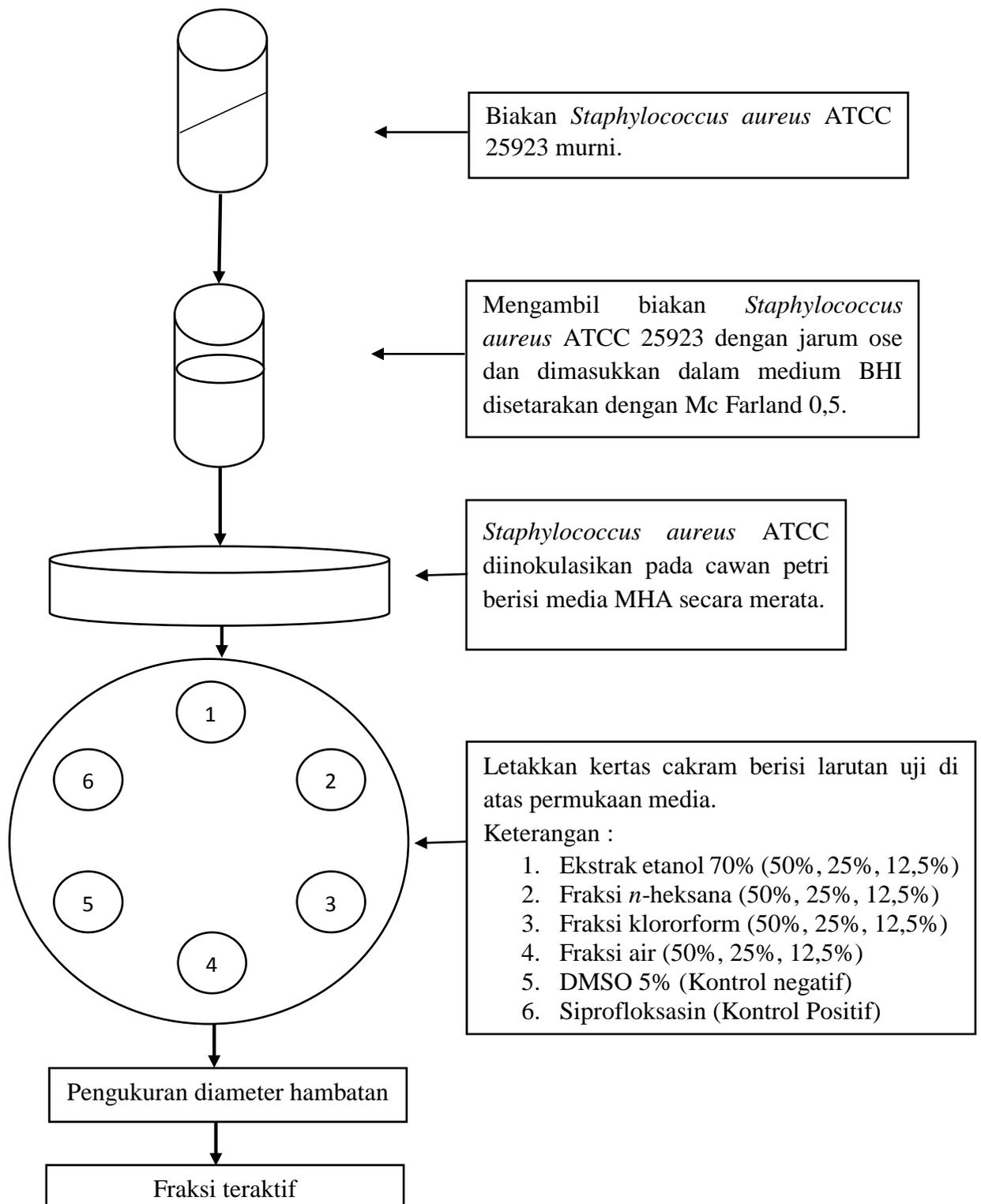
asetat : kloroform (5 : 1 : 4) dengan baku pembanding stigmasterol. Positif mengandung sterol bila terbentuk warna biru, ungu sampai coklat saat dideteksi di bawah sinar UV<sub>366</sub> (Risnafiani *et al.* 2015).

#### **E. Analisis Hasil**

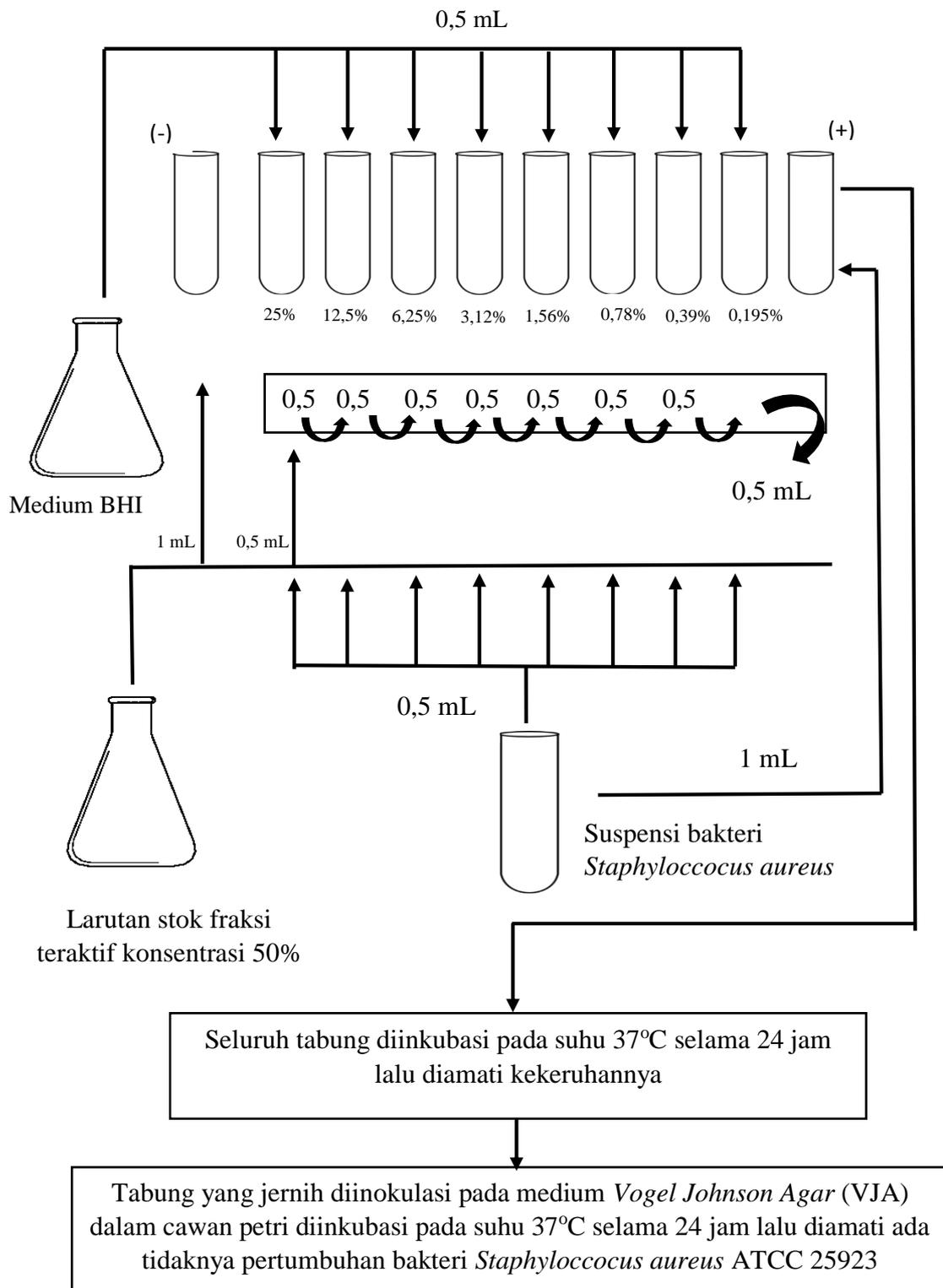
Hasil penelitian dianalisis berdasarkan aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun karandas terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *Kolmogorof-Sminov*, jika terdistribusi secara normal dilanjutkan dengan uji parametrik yaitu *Analysis Of Varian* (ANOVA) *One Way*, tetapi jika terdistribusi tidak normal dilanjutkan dengan uji non parametrik.



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



**Gambar 2.** Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksana, kloroform dan air dari daun karandas terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan metode difusi.



**Gambar 3.** Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun karandas terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan metode dilusi.