

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) yang diambil dari Kelompok Tani Gondosuli, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) yang berbentuk pipih, ramping, memanjang, berwarna hijau, tidak terkena hama, beraroma tajam dan diambil dari Kelompok Tani Gondosuli, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang membuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama dalam penelitian ini adalah serbuk daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan larutan penyari etanol 70% dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan *n*-heksana, etil asetat dan air.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak pelarut etanol 70% dengan metode maserasi, fraksi air, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) terhadap bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan berdasarkan pola hubungan sebab akibat menjadi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) yang diberikan dalam berbagai konsentrasi.

Variabel terkontrol merupakan variabel - variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar basil yang ditetapkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, media, suhu inkubasi, waktu inkubasi, kondisi laboratorium dan sterilisasi.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan menilai zona hambat pertumbuhan bakteri dan kekeruhan media uji.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) adalah daun kucai yang diambil dari Kelompok Tani Gondosuli, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun kucai adalah daun kucai yang diambil kemudian dibersihkan dari pengotor, dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 50 °C lalu dihaluskan dengan blender, kemudian diserbuk dan di ayak dengan ayakan no.40.

Ketiga, ekstrak adalah hasil ekstraksi serbuk daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol sampai kental yang kemudian dipisahkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 40 °C.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah ekstrak daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) didispersikan dengan pelarut etanol - air kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu dari ekstrak daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) dengan *n*-heksana yang kemudian difraksinasi dengan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air dari daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) adalah residu dari fraksinasi etil asetat

Ketujuh, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah bakteri uji yang diperoleh dari laboratorium universitas setia budi, surakarta.

Kedelapan, aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dengan melihat zona hambat pertumbuhan bakteri dengan berbagai konsentrasi 25%, 20% dan 15%. Kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif antibiotik gentamisin. Metode dilusi yaitu berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi dengan cara penapisan hingga konsentrasi akhir sebagai berikut 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.19%, 0.09%, 0,04%, kontrol positif suspensi bakteri dan kontrol negatif adalah ekstrak/ fraksi.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1. Bahan dan sampel. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.). Sampel bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang ATCC 27853 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

1.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, *n*-heksana, etil asetat, asam sulfat, FeCl₃ 1%, HCl 2 N, pereaksi Dragendorff, Lieberman Bouchardat, Mayer, glisirisin, rutin, papaverin, stigmasterol, asam galat, asam asetat, magnesium, kloroform, aquadest steril, DMSO 5%, standar Mc Farland 0,5% dan gentamisin.

1.3. Medium. Medium yang digunakan adalah Brain Heart Infusion (BHI), Mueller Hilton Agar (MHA), Sulfida Indol Moltility (SIM), Kligler Iron Agar (KIA), Lysine Iron Agar (LIA), *Citrat*, Pseudomonas Selektif Agar (PSA).

2. Alat

Beberapa macam alat yang digunakan dalam penelitian antara lain alat blender, botol maserasi, corong Buchner, oven dengan suhu rendah dan konstan, *moisture balance*, ayakan no. 40, timbangan analitik, pipet volum, alat gelas lain yang digunakan seperti labu erlenmayer, gelas ukur, batang pengaduk dan tabung reaksi.

Alat aktivitas antibakteri digunakan adalah autoklaf, inkubator, kapas lidi steril, pinset, oven, pembakar spiritus, kasa, kaki tiga, pipet ukur, cawan petri, syringe, jarum ose dan gelas obyek.

D. Jalannya penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama penelitian ini adalah melakukan determinasi daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) yang berkaitan dengan morfologi daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) yang dilakukan di bagian Laboratorium mikrobiologi, Fakultas Biologi Universitas Sebelas Maret. Determinasi ini bertujuan untuk mencocokkan ciri morfologi yang ada pada daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

2. Persiapan bahan

Daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) berasal dari Kelompok Tani Gondosuli, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Daun yang diambil dalam keadaan segar, disortasi basah, dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran atau debu yang menempel, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50 °C sampai didapat daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) dengan kadar air tertentu, pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, untuk menjamin dalam penyimpanan, mencegah pertumbuhan jamur dan mencegah proses atau reaksi enzimatika yang dapat menurunkan mutu.

3. Penetapan persen rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah

Persen rendemen diperoleh dari penimbangan hasil dari daun kering kemudian dibagi berat basah daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) dikalikan 100%

$$(\%)Rendemen = \frac{\text{Berat daun kering (gram)}}{\text{Berat daun basah (gram)}} \times 100\%$$

4. Pengeringan daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

Daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) yang sudah kering kemudian diserbukkan dengan cara diblender, diayak dengan ayakan no. 40. Hasil penyerbukan disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat agar tidak terkena cemaran.

5. Penetapan persen rendemen serbuk daun kucai

Persen rendemen diperoleh dari penimbangan hasil dari berat serbuk daun kemudian dibagi berat basah daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) dikalikan 100%

$$(\%)Rendemen = \frac{\text{Berat serbuk (gram)}}{\text{Berat daun basah (gram)}} \times 100\%$$

6. Penetapan kadar lembab serbuk daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

Penetapan kadar lembab dilakukan dengan cara serbuk daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian diukur kadar lembab serbuk dengan alat *moisture balance*. Serbuk daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) hasil pengeringan kemudian ditimbang dan dihitung kadar lembabnya dengan persyaratan tidak lebih dari 10%.

7. Pembuatan ekstrak etanol daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

Sebanyak 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok dimasukkan ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindungi dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari sari diserikai, ampas diperas. Ampas ditambah cairan penyari secukupnya diaduk dan diserikai, sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Bejana ditutup, dibiarkan di tempat sejuk,

terlindungi dari cahaya, selama 2 hari kemudian endapan dipisahkan (DepKes RI 1986).

8. Penetapan persen rendemen ekstrak daun kucai

Persen rendemen diperoleh dari penimbangan hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) kering dikalikan 100%

$$(\%)Rendemen = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat serbuk daun kucai}}$$

9. Uji bebas etanol ekstrak daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

Ekstrak yang telah pekat diuji sudah bebas atau belum dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol jika tidak terbentuk ester yang khas dari etanol. Tujuan dilakukannya tes bebas etanol ini bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

10. Penetapan kadar air ekstrak daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

Penetapan kadar air pada penelitian ini menggunakan metode destilasi dengan alat *Sterling Bidwell*. Prinsip dari penetapan kadar air dengan metode destilasi adalah mengeluarkan air menggunakan pelarut yang memiliki titik didih yang lebih tinggi daripada air, tidak tercampur dengan air, dan memiliki berat jenis yang lebih rendah daripada air (Rohman & Sumantri 2014). Prosedurnya yaitu pertama tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan asam pencuci, lalu dibilas dengan air dan dikeringkan dalam lemari pengering. Bahan ditimbang seksama yang diperkirakan mengandung 2 mL sampai 4 mL air, kemudian dimasukkan kedalam labu kering yang sebelumnya sudah dimasukkan batu didih untuk mencegah letupan akibat panas. Toluena jenuh air sebanyak 200 mL ditambahkan kedalam labu, kemudian rangkaian alat dipasang. Labu dipanaskan hingga semua air terdestilasi atau air pada penampung tidak bertambah lagi. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluena jenuh air sambil dibersihkan dengan sikat yang telah dibasahi dengan toluena jenuh air, kemudian penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Setelah selesai, tabung penerima didinginkan pada suhu ruang, jika ada tetes air

yang melekat, tabung pendingin dan tabung penerima digosok dengan karet yang diikatkan pada kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen jenuh air hingga tetesan air turun. Volume air pada penampung dibaca setelah air dan toluen terpisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (DepKes RI 2000 & Kemenkes RI 2011).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume air (mL)}}{\text{Bobot awal serbuk (gram)}} \times 100\%$$

11. Uji kandungan senyawa kimia ekstrak daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

11.1 Identifikasi tanin. Sampel sebanyak 0,1 gram dididihkan dalam 20 mL air lalu disaring. Filtrat ditambahkan FeCl₃ 1%, vortek hingga mengalami perubahan warna. Sampel dinyatakan positif apabila mengalami perubahan warna coklat kehijauan atau biru kehitaman, dengan baku pembanding asam galat (Alamsyah *et al.* 2014).

11.2 Identifikasi saponin. Sampel sebanyak 0,1 gram dilarutkan kedalam 20 mL air panas. Kocok dengan kuat, ditambahkan 1 tetes HCl 2N. Sampel dinyatakan positif jika busa masih terbentuk selama 30 menit setelah penetesan HCl 2N, dengan baku pembanding gliserin (Alamsyah *et al.* 2014).

11.3 Identifikasi alkaloid. Sampel sebanyak 2 gram dilarutkan dengan air panasa kemudian disaring, filtrat yang didapatkan ditambah dengan 2 mL H₂SO₄ 2N dan dikocok dengan kuat, kemudian larutan tersebut dibagi menjadi 3 bagian diletakkan pada tabung reaksi. Setelah itu masing-masing tabung reaksi ditetesi dengan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorf. Jika hasilnya berturut-turut terbentuk endapan putih, coklat, dan merah atau jingga maka sampel mengandung alkaloid (Putri 2015).

11.4 Identifikasi triterpenoid/steroid. Ekstrak sebanyak 2 gram dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini selanjutnya ditambah dengan 1-2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung tersebut, jika hasil yang diperoleh berupa cincin merah kecoklatan atau violet pada perbatasan

dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid (Indrayani *et al.* 2006).

11.5 Identifikasi flavonoid. Sampel sebanyak 0,1 gram ditambahkan 10 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat yang didapat kemudian ditambahkan 0,5 gram serbuk Mg, 1 mL HCl pekat dan amil alkohol. Campuran dikocok kuat, sampel dinyatakan positif apabila timbul warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol, dengan baku pembanding kuersetin dan rutin (Alamsyah *et al.* 2014).

12. Pembuatan fraksi daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

Fraksinasi dari ekstrak etanolik dari daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) dibuat dengan menimbang ekstrak hasil maserasi di dalam beaker glass sebanyak 10 gram. Ekstrak etanol yang sudah ditimbang disuspensikan dengan aquadest sebanyak 75 mL kemudian dipisahkan di corong pisah dengan menambahkan *n*-heksan 75 mL, dipartisi sebanyak tiga kali. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan oven dan disebut sebagai fraksi *n*-heksan.

Residu dari fraksinasi *n*-heksana dipisahkan di corong pisah dengan menambahkan etil asetat 75 mL, dipartisi sebanyak tiga kali. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan oven 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 dengan menggunakan oven suhu ± 50 °C lalu ditimbang dan disebut sebagai fraksi air.

13. Sterilisasi alat dan bahan

Seluruh alat dan bahan yang akan digunakan dilakukan pencucian hingga bersih dan dilanjutkan pengeringan. Langkah selanjutnya dilakukan dengan pensterilan terlebih dahulu alat-alat dan gelas yang ada ukuran dengan oven pada suhu 170 °C selama 30 menit, begitu juga dengan media agar yang digunakan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanas api langsung.

14. Pembuatan Media

14.1 Pembuatan media Brain Heart Infusion (BHI). Serbuk medium BHI ditimbang sebanyak 37 g, kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass*, ditambahkan *aqua destilata* sebanyak 1 L dan dipanaskan hingga larut. Larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. pH: $7,4 \pm 0,2$.

14.2 Pembuatan media Mueller Hinton Agar (MHA). Serbuk medium MHA ditimbang sebanyak 34 g, kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass*, ditambahkan *aqua destilata* sebanyak 1 L dan dipanaskan hingga mendidih dan larut. Larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 115°C selama 10 menit. pH: $7,4 \pm 0,2$.

15. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 diambil dari biakan murni sebanyak 1 ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media cair BHI kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37 °C. Tabung reaksi yang berisi BHI dan bakteri uji setelah diinkubasi kemudian disetarakan kekeruhannya dengan standart Mc Farland 0,5 yang dianggap setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL

16. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

16.1 Identifikasi bakteri berdasarkan koloni. Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasikan pada medium Pseudomonas Selektif Agar (PSA) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 - 48 jam. Penampakan membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen yang berwarna kehijauan (Jawetz *et al.* 2014).

16.2 Identifikasi secara fisiologi. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat diketahui sifat fisiologinya dengan inokulasi pada media uji biokimia. Macam media yang digunakan inokulasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* adalah Klinger Iron Agar (KIA), Lysine Iron Agar (LIA), Sulfide Indol Motilitas (SIM), dan Citrat. Masing-masing media tersebut diinkubasi pada suhu 37° C

selama 24 - 48 jam. Hasilnya dapat diketahui dengan perubahan warna masing – masing media atau dengan penambahan reagen (Bonang & Koeswardono 1982).

16.2.1 Media Sulfida Indol Motility (SIM). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Pengujian SIM memberikan hasil (– – +) artinya uji H₂S negatif ditandai dengan tidak adanya pembentukan warna hitam pada media SIM, pada penambahan reagen Erlich A dan B permukaan media tidak berwarna merah ini berarti uji indol negatif, uji motilitasnya positif, ditunjukkan dengan adanya penyebaran pertumbuhan bakteri di media SIM (Bonang & Koeswardono 1982).

16.2.2 Media *Kliger Iron Agar* (KIA). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, kemudian diamati pada bagian lereng dasar, terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Memberikan hasil K/KS–, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak memfermentasi glukosa dan laktosa, S– artinya uji H₂S negatif ditunjukkan tidak adanya pembentukan warna hitam pada media KIA (Bonang & Koeswardono 1982).

16.2.3 Media *Lysine Iron Agar* (LIA). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan gores kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, kemudian diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Pengujian dengan media LIA memberikan hasil K/KS–, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin, S– artinya uji H₂S negatif ditunjukkan tidak adanya warna hitam pada media LIA. *Lysine Iron Agar* (LIA) dapat digunakan untuk identifikasi mikroba penghasil enzim yang mampu mendekarboksilasi asam amino lisin dan memproduksi gas H₂S (Bonang & Koeswardono 1982).

16.2.4 Media Citrat. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan gores kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri

menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru (Bonang & Koeswardono 1982).

16.3 Identifikasi bakteri secara morfologi. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang. Pewarnaan Gram berguna untuk dapat meyakinkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* merupakan Gram negatif. Pewarnaan Gram dimulai dengan pemberian zat warna dasar, kristal violet. Larutan iodium diberikan selanjutnya, seluruh bakteri akan terwarnai biru pada tahap ini dalam proses pewarnaan, kemudian sel diberikan alkohol. Sel Gram positif akan tetap mempertahankan kompleks kristal violet-iodin sehingga tetap berwarna biru, sel Gram negatif kehilangan warna oleh alkohol. Sebagai langkah akhir, zat warna lawan, safranin (pewarna merah) diberikan sehingga sel – sel Gram negatif yang tidak berwarna akan berwarna merah sedangkan sel Gram positif akan tetap berwarna ungu (Jawetz *et al.* 2014).

17. Aktivitas antibakteri dengan metode difusi

Hasil maserasi, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan fraksi air dari daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) yang didapatkan diuji secara mikrobiologi dengan bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Metode yang digunakan adalah metode difusi untuk menentukan luas zona hambat terhadap bakteri uji.

Metode difusi dengan cawan petri steril yang telah diisi media MHA. Larutan ekstrak, fraksi *n*-heksan dengan konsentrasi 25 %, 20 %, 15 % b/v dengan pengencer *n*-heksan, fraksi etil asetat dan air dengan konsentrasi 25 %, 20 %, 15 % b/v dengan pengencer DMSO 5 %. Bakteri diinokulasi pada cawan petri dengan cara digores, kemudian tempatkan 6 cakram yang sudah ditetesi larutan uji sebanyak 50 μ L dengan mikropipet kemudian ditunggu \pm 5 menit. Kertas cakram ditempel diatas media MHA dengan jarak yang sama dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, kemudian dilakukan pengukuran pada zona hambat yang terbentuk. Cakram pertama gentamisin sebagai kontrol (+), cakram yang ke dua dengan larutan stok etanolik daun kucai (*Allium schoenoprasum* L), cakram ke tiga dengan larutan stok fraksi *n*-heksan, cakram ke empat dengan larutan stok fraksi etil asetat, cakram ke lima dengan larutan

stok fraksi air, cakram ke enam diberi pelarut DMSO 5% sebagai kontrol (-). Replikasi dilakukan tiga kali. Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C dan diamati hasilnya. Diameter zona hambat sekitar cakram diukur, dinyatakan dalam satuan mm.

Ketentuan kekuatan antibakteri adalah sebagai berikut: diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, zona hambat 5 - 10 mm dikategorikan sedang, zona hambat 10 – 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat (Davis & Stout 1971).

18. Aktivitas antibakteri dengan metode dilusi

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Maksimum dari fraksi teraktif. Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung yang terdiri dari 12 tabung, dengan konsentrasi 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.19%, 0.09%, 0,04%, kontrol (+) dan kontrol (-). Media BHI dimasukkan 0,5 mL pada tiap tabung kecuali tabung 1, 2 dan 12. Secara aseptis, masukkan 1 mL larutan stok (fraksi etil asetat) yang akan diuji pada tabung 1. Kemudian pada tabung 2 dan tabung 3 dimasukkan 0,5 mL larutan stok, kemudian tabung 3 dipipet 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung 4 begitu seterusnya sampai tabung 11 kemudian dibuang. Tambahkan 0,5 mL biakan bakteri dari tabung 2 sampai tabung 11, pada tabung 12 ditambahkan 1 mL. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Diamati ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh Konsentrasi terendah pada media selektif *Pseudomonas* Selektif Agar (PSA) yang tidak menunjukkan koloni yang tumbuh.

19. Identifikasi kandungan kimia fraksi aktif secara KLT

Fraksi yang paling aktif diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi yang dinyatakan paling aktif ditotolkan dengan pipa kapiler diatas lempeng kromatografi kemudian dielusikan dengan jarak pengembang 8 cm.

KLT mula-mula dilakukan penjenjuran dengan uap fase gerak yang sesuai didalam suatu bejana (*chamber*) yang dindingnya telah dilapisi dengan kertas saring. Sehingga atmosfer di dalam bejana jenuh dengan fase gerak kemudian dilakukan elusi sampai fase gerak mencapai batas elusi, setelah pengembangan lempeng kromatografi lapis tipis dikeringkan, dilakukan deteksi dibawah sinar UV dan pereaksi lainnya. Bercak yang terdeteksi ditentukan harga Rf dan penampakan warnanya.

19.1 Identifikasi alkaloid. Senyawa alkaloid dapat diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak etil asetat : metanol : air (4 : 5 : 1) dimasukkan dalam *chamber*, dibiarkan sampai jenuh, pada silika gel GF₂₅₄ ditotolkan kira-kira 5 µl sari etil asetat dimasukkan dalam *chamber*, dielusi sampai tanda batas, diambil dan dibiarkan sampai kering. Fraksi mengandung alkaloid bila dilihat di bawah sinar UV 366 nm berflourosensi atau berwarna jingga dengan pereaksi *dragendorf*, dengan baku pembanding papaverin (Sari 2017).

19.2 Identifikasi saponin. Adanya senyawa saponin dapat diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis digunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ fase gerak yang digunakan kloroform : metanol : air (13 : 7 : 2). Setelah lempeng kromatografi dibiarkan terelusi hingga eluen merambat sampai pada tanda garis tepi. Pengamatan noda dengan lampu UV 254 dan 366 nm. Lempeng juga disemprotkan dengan pereaksi LB dan dipanaskan pada suhu 110 °C selama 10 menit untuk membentuk warna noda yang jelas. Terbentuk bercak noda gelap atau ungu dengan pereaksi saponin, dengan baku pembanding gliserisin (Rachman 2018).

19.3 Identifikasi tanin. Senyawa tanin dapat diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5). dengan penampak noda Pereaksi FeCl₃. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna ungu kehitaman pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm, dengan baku pembanding asam galat (Sholikhah 2016).

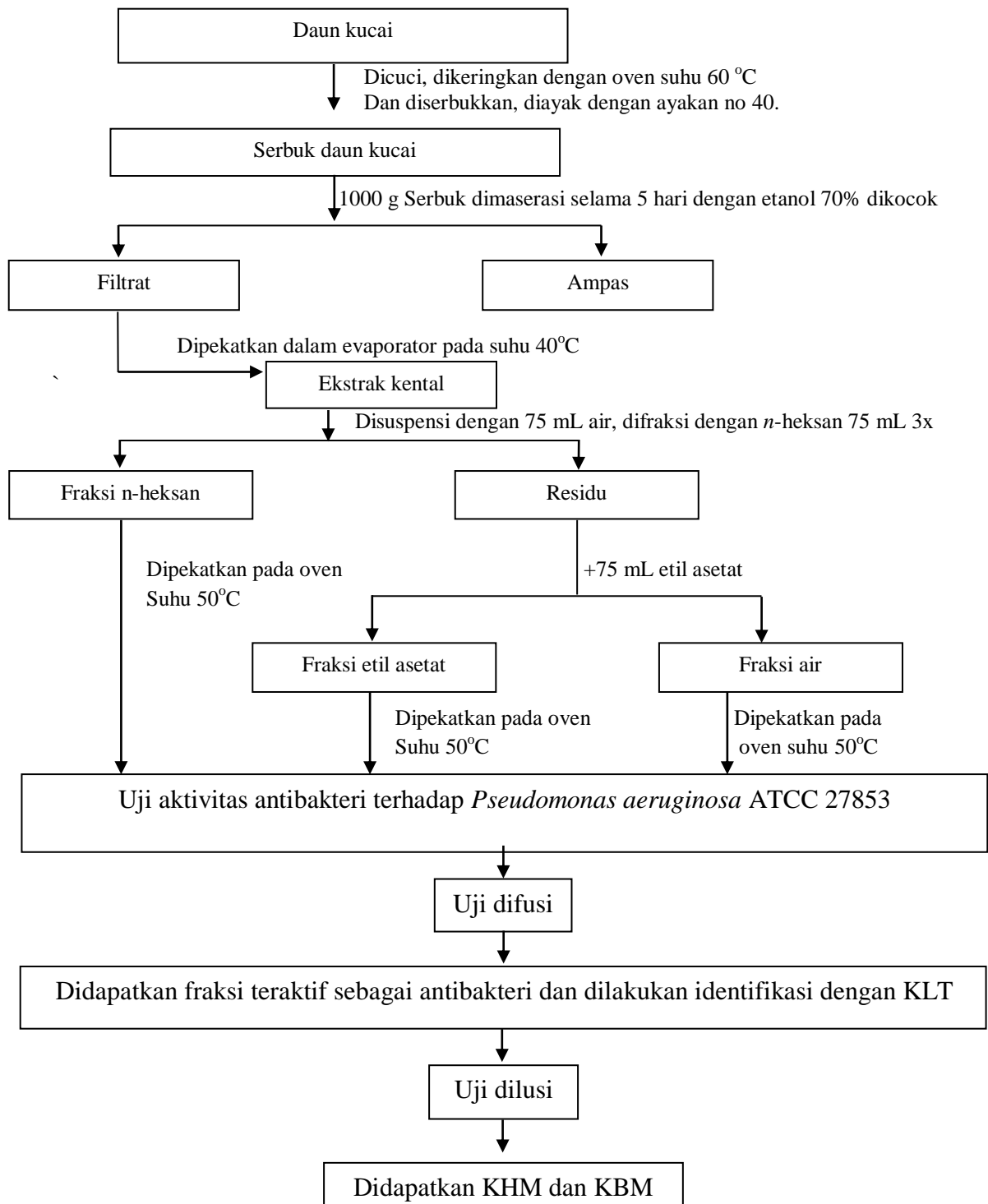
19.4 Identifikasi flavonoid. Senyawa flavonoid dapat diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak yang digunakan butanol : asam asetat : air (3 : 1 : 1) dengan penampak noda uap amonia. Pada UV 254 nm terjadi peredaman, UV 366 nm terbentuk fluoresensi biru menegaskan ada kandungan flavonoid, dengan baku pembanding rutin (Marliana 2005).

19.5 Identifikasi triterpenoid. Senyawa triterpenoid dapat diidentifikasi dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak yang digunakan adalah kloroform : metanol (7 : 3) dengan penampak noda pereaksi Liberman Burchard disertai dengan pemanasan pada suhu 105 °C selama 5 menit. Reaksi positif steroid ditunjukkan dengan adanya noda berwarna ungu muda, dengan baku pembanding stigmasterol (Anam 2015).

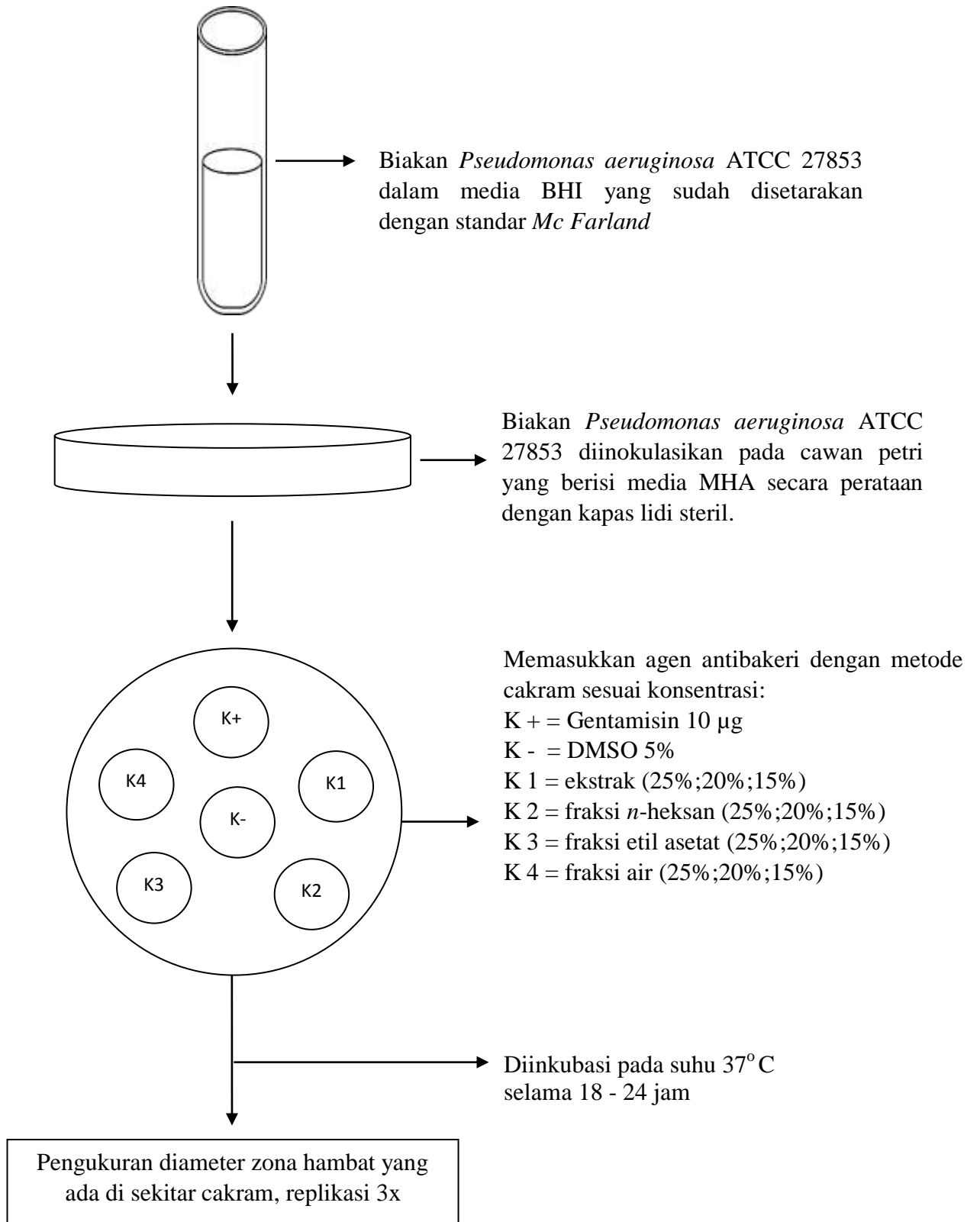
E. Analisis Hasil

Data yang diperoleh dari pengujian antibakteri ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat dan air dari daun kucai (*Allium schoenoprasum L.*), terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode difusi untuk mencari zona hambat dan fraksi yang teraktif dan metode dilusi untuk mengetahui nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan nilai KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). Hasil data yang diperoleh dilanjutkan dengan analisis metode ANOVA satu jalan.

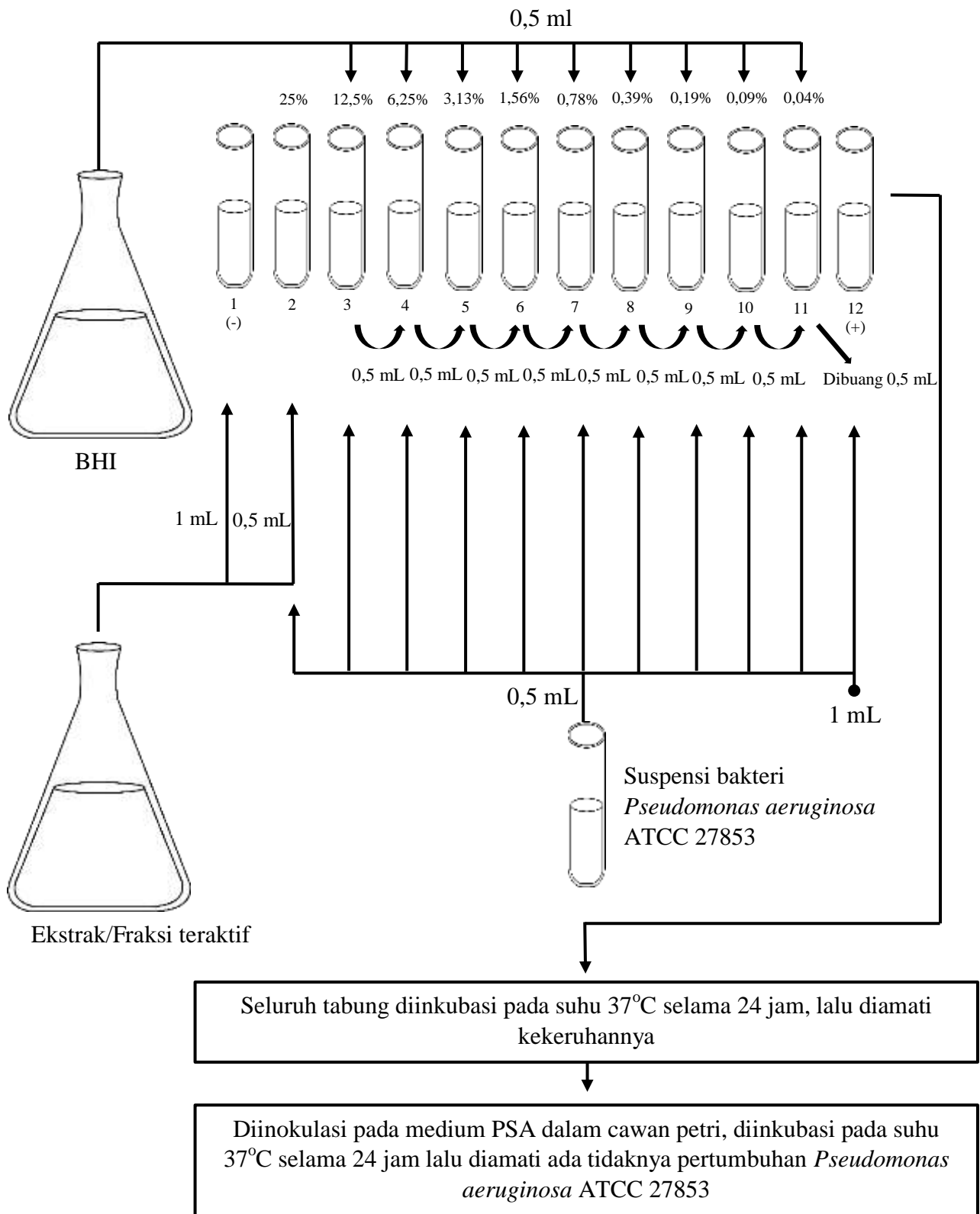
F. Skema cara kerja



Gambar 2. Skema diagram kerja ekstrak etanolik 70%, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air daun kucai, dan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Gambar 3. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri daun kucai terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode difusi



Gambar 4. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri daun kucai terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode dilusi.

