

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) yang berasal dari tanaman stevia yang ditanam di Desa Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni I M.). Daun yang diambil secara acak dengan memilih daun bewarna hijau, masih segar, bebas dari hama, dan dipanen saat umur dua bulan dari Desa Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Januari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian yang pertama adalah ekstrak etanol 70% dilanjutkan dengan fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air daun stevia.

Variabel utama ke dua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 70% daun stevia, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun stevia terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan berdasarkan pola hubungan sebab akibat menjadi variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan data diulang peneliti lain secara cepat. Sedangkan variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun stevia, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air.

2.2 Variabel terkendali. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175, kondisi laboratorium (antara lain: kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, tempat tumbuh tanaman, waktu panen dan metode ekstraksi.

2.3 Variabel tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang terbentuk dari pemberian ekstrak etanol serta fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun stevia.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun stevia adalah bagian dari tanaman stevia yang diperoleh dari Desa Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun stevia adalah daun stevia yang diambil kemudian dicuci dengan air mengalir. Proses pencucian bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel. Daun dikeringkan dengan pemanas buatan yaitu dioven pada suhu 50°C. Daun stevia yang sudah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol 70% daun stevia adalah hasil ekstraksi serbuk daun stevia dengan pelarut etanol 70% secara maserasi.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah fraksi dari ekstrak etanol 70% daun stevia yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan sebagai pelarut nonpolar, kemudian dipekatkan diatas *waterbath* sehingga didapat fraksi *n*-heksan.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksi dari air residu fraksi *n*-heksan dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar, kemudian dipekatkan diatas *waterbath* sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah hasil fraksinasi dari residu etil asetat dengan menggunakan air sebagai pelarut polar, kemudian dipekatkan diatas *waterbath*.

Ketujuh, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 adalah bakteri Gram positif yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri adalah uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan menggunakan metode difusi untuk mengukur diameter zona hambat, metode dilusi untuk mengukur konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,3125%; 0,1563%; 0,0782%.

Kesembilan, KBM adalah konsentrasi terkecil yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi pada media.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Pembuatan serbuk simplisia serta analisisnya alat yang digunakan adalah yaitu oven, alat penggiling (*hammer mill*), timbangan, neraca analitik, dan, ayakan nomor 40, blender.

Proses maserasi dan fraksinasi alat yang digunakan adalah kain flanel, corong *buchner*, gelas ukur, botol kaca coklat, *rotary evaporator*, *waterbath*, kertas saring, corong pisah, corong kaca. Alat penetapan kadar air dengan *Sterling Bidwel*, alat susut pengeringan dengan *moisture balance*.

Identifikasi kandungan senyawa alat yang digunakan adalah *beaker glass*, batang pengaduk, gelas ukur, tabung reaksi, pipet tetes dan erlenmeyer.

Uji aktivitas antibakteri alat yang digunakan adalah autoklaf, oven, inkas, jarum ose, kapas lidi steril, gelas ukur, kaca objek, pinset, mikroskop, alat *boor prop*, penggaris, cawan petri, pipet volume, pipet ukur, pipet tetes, tabung reaksi, dan *beaker glass*.

2. Bahan

2.1 Bahan utama. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.). Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Streptococcus mutans* ATCC 25175 biakan murni.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah toluen, pelarut etanol 70%, *n*-heksan, etil asetat, air, *Mc Farland* 0,5, *aqua destilata*,

HCl, Mg, amil alkohol, kloroform, anhidra asesat, asam sulfat pekat, Pereaksi semprot FeCl₃, sitroborat, Lieberman burchard, Dregendorf, baku pembanding rutin, asam galat, glisirisin, papaverin, stigmasterol, DMSO 5%, reagen mayer, reagen wagner, cat kristal violet (Gram A), larutan yodium (Gram B), alkohol 95% (Gram C), safranin (Gram D), dan antibiotik ciprofloxacin.

2.3 Medium. Medium yang digunakan *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Manitol Salt Agar* (MSA), dan media agar darah.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman merupakan proses identifikasi tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.) untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman stevia sesuai kepustakaan dan dibuktikan dibagian Biologi Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk daun stevia dilakukan dengan cara daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.) dicuci bersih terlebih dahulu dengan air mengalir sampai terbebas dari kotoran dan debu. Daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.) yang sudah bersih ditimbang, setelah itu dioven pada suhu 50°C. Daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.) yang sudah kering diserbuk dengan alat penggiling kemudian diayakan dengan ayakan no 40 sehingga diperoleh serbuk daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.) disimpan dalam wadah yang kering serta ditutup rapat.

3. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan serbuk daun stevia pada penelitian ini dilakukan di laboratorium teknologi farmasi Universitas Setia Budi. Penetapan susut serbuk daun stevia dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Serbuk ditimbang 2 gram, dimasukkan ke dalam alat *moisture balance*. Kemudian *moisture balance* ditutup dan ditunggu sampai ada bunyi pada alat sebagai tanda bahwa proses sudah selesai. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat *moisture balance* dicatat sebagai kadar susut pengeringan. Kadar lembab

memenuhi syarat dimana suhu serbuk dari simplisia tidak boleh lebih dari 10% (Depkes 2000).

4. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun stevia

Penetapan kadar air menggunakan alat *Sterling Bidwell* dengan metode destilasi. Tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan asam pencuci, lalu dibilas dengan air dan dikeringkan dalam lemari pengering. Pelarut yang digunakan adalah toluen yang dijenuhkan dengan air terlebih dahulu. Toluene 200 mL dengan air dikocok dan didiamkan, kedua lapisan air dan toluen akan memisah, lapisan air dibuang. Sebanyak 20 gram serbuk daun stevia ditimbang, dimasukkan kedalam labu alas bulat, dan ditambahkan dengan toluen yang telah dijenuhkan dengan air. Alat *Sterling Bidwell* dipasang dan toluen dituangkan dalam labu. Labu dipanaskan selama 15 menit, tunggu sampai air pada penampung tidak bertambah lagi. Setelah semua toluene mendidih, pendingin dicuci dengan toluene sambil dibersihkan dengan sikat kecil dan sulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima dibiarkan mendingin sampai temperature kamar. Setelah lapisan air dan toluen memisah sempurna, volum air dibaca dan dihitung kadar air dalam % terhadap berat simplisia semula (Handayani *et.al* 2017).

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

5. Pembuatan ekstrak etanol

Pembuatan ekstrak daun stevia dilakukan dengan metode maserasi, pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan perbandingan 1:10 yaitu 1 bagian (gram) serbuk simplisia : 10 bagian (mL) pelarut. Serbuk daun stevia ditimbang sebanyak 600 gram dimasukkan ke botol kaca gelap, kemudian dituangi dengan 75 bagian penyari (sebanyak 4,5 L pelarut etanol 70%). Campuran di dalam botol maserasi ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil digojok berulang. 5 hari setelah direndam sari disaring dengan kain flanel kemudian ampas diperas. Ampas di tambah cairan penyari sebanyak 25 bagian (1,5 L etanol 70%), ampas dan penyari dimasukkan ke dalam botol kaca gelap, ditutup dibiarkan selama 2 hari, terlindung dari cahaya sehingga diperoleh

seluruh sari sebanyak 100 bagian. 2 hari setelah didiamkan campuran di saring dengan kain flanel (Depkes 1986). Hasil penyarian pertama dan kedua dijadikan satu untuk disaring kembali dengan corong *Buchner*. Hasil dipekatkan dengan *vaccum rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan dimasukkan ke dalam botol steril agar tidak ditumbuhi mikroba.

Penetapan persen rendemen dengan cara menimbang hasil ekstrak pekat dibagi dengan berat serbuk, kemudian dikalikan 100 %.

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

6. Tes bebas etanol ekstrak daun stevia

Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat pekat dan asam sulfat pekat dalam tabung reaksi kemudian dipanaskan, uji positif etanol ditandai dengan tidak terbentuk bau ester (Raymon *et al.* 2016). Tujuan dilakukannya tes bebas etanol ini agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri. Identifikasi senyawa ini dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi.

7. Fraksinasi dari ekstrak etanol daun stevia

7.1 Pembuatan fraksi *n*-heksan daun stevia. Ekstrak etanol 70% sebanyak 10 g dimasukkan ke dalam beaker glass, ditambah air 75 mL untuk melarutkan, kemudian dimasukkan dalam corong pisah, difraksinasikan dengan pelarut *n*-heksan 75 mL dalam corong pisah, fraksi yang ada diatas (fraksi *n*-heksan) dipisahkan dengan fraksi yang bagian bawah (fraksi air) dilakukan dengan penambahan *n*-heksan sebanyak 5 kali. Fraksi *n*-heksan yang didapat kemudian dipekatkan di atas *waterbath*, fraksi yang didapat ditimbang.

7.2 Fraksinasi etil asetat dari daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).

Hasil sisa fraksinasi dengan *n*-heksan difraksinasi dengan pelarut etil asetat 75 mL dalam corong pisah. Filtrat yang dibawah (fraksi air) dipisahkan dengan filtrat yang bagian atas (fraksi etil asetat), dilakukan dengan penambahan pelarut etil asetat sebanyak 5 kali. Fraksi etil asetat yang didapat kemudian dipekatkan di atas *waterbath* fraksi yang didapat ditimbang.

7.3 Fraksinasi air daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air. Filtrat yang telah diperoleh kemudian dipekatkan diatas *waterbath* sampai kental fraksi yang didapat ditimbang.

8. Pengujian kandungan senyawa kimia

8.1 Flavonoid. Ekstrak etanol daun stevia ditimbang sebanyak \pm 0,5 g dilarutkan dengan aquadest 10 mL dalam tabung reaksi, mendidihkan campuran selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 0,5 mg bubuk Mg, ditambahkan 1 mL HCl pekat dan amil alkohol. Dicampur dan dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditandai dengan warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah *et al.* 2014).

8.2 Alkaloid. Ekstrak etanol daun stevia ditimbang sebanyak \pm 0,5 g ditambahkan 1 mL HCl 2 N. Dibuat dalam 3 tabung. Tabung 1 ditambahkan reagen Mayer terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan. Tabung 2 ditambahkan reagen Dragendorff terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga. Tabung 3 ditambahkan reagen Wagner, hasil positif ditandai dengan terbentuk endapan merah kecoklatan (Alamsyah *et al* 2014).

8.3 Steroid. Ekstrak etanol daun stevia ditimbang sebanyak \pm 0,5 g ditambah asam asetat anhidrat, lalu ditambahkan kloroform dan ditambah asam sulfat melalui dinding tabung reaksi (Alamsyah *et al* 2014). Adanya steroid pada batas kedua larutan terdapat cincin berwarna merah kecoklatan atau ungu (Fitriyani *et al.* 2011).

8.4 Uji saponin. Ekstrak etanol ditimbang sebanyak \pm 0,5 g dilarutkan kedalam 20 mL air panas. Kocok dengan kuat, tambahkan 1 tetes HCl 2 N. Sampel dinyatakan positif jika busa masih terbentuk selama 30 menit setelah penetesan HCl 2 N (Alamsyah *et al* 2014).

8.5 Uji tanin. Ekstrak etanol daun stevia ditimbang sebanyak \pm 0,5 g didihkan dalam 20 mL air lalu disaring. Filtrat ditambahkan FeCl_3 1 %. Larutan mengalami perubahan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin katekol (Alamsyah *et al* 2014).

9. Sterilisasi

Sterilisasi alat dan bahan perlu dilakukan agar tidak terjadi kontaminasi yang dapat merusak hasil uji. Peralatan yang terbuat dari kaca seperti cawan petri, *beaker glass*, gelas ukur dan tabung reaksi, lidi steril disterilisasi dengan oven pada suhu 160-180°C selama 1-2 jam. Peralatan lainnya seperti kaca objek, jarum ose, pipet tetes, pipet volume, pipet ukur, dan pinset disterilisasi dengan cara fiksasi menggunakan lampu spiritus. Inkas disterilisasi dengan alkohol. Bahan yang akan digunakan seperti media, aquadest disterilkan dengan autoklaf (pemanasan basah) pada suhu 121°C selama 15 menit.

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dalam biakan murni diambil dengan ose steril, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi media *Brian Heart Infussion* (BHI). Suspensi bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil inkubasi disesuaikan kekeruhannya dengan *Mc Farland* 0,5 yang menunjukkan konsentrasi kekeruhan bakteri sama dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

11. Identifikasi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175

11.1 Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram Identifikasi mikroskopis bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dilakukan dengan cara pengecatan Gram. Pertama dibuat apusan diatas objek glass, kemudian difiksasi. Proses selanjutnya ditetesi pewarna Gram A yang berisi Kristal violet selama 1 menit, lalu cuci dilanjutkan ditetesi dengan pewarna Gram B yang berisi lugol iodin sebagai mordan selama 1 menit. Pengujian dilanjutkan dengan mencuci kembali dan dilanjutkan menetes dengan pewarna Gram C sebagai peluntur selama 30 detik kemudian dicuci. Terakhir ditetesi dengan pewarna Gram D yang berisi safranin selama 1 menit kemudian dicuci dan dikeringkan, tahap berikutnya setelah kering diamati dengan mikroskop, jika didapat hasil berbentuk coccus berderet dan berwarna violet maka hasil pewarnaan adalah Gram positif bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Hasil positif pewarnaan Gram *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dibawah mikroskop memperlihatkan koloni berbentuk bulat tersusun seperti rantai dan berwarna ungu.

11.2 Uji makroskopis pada media MSA. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dari kultur murni kemudian ditusukkan pada media *Manitol Salt Agar* (MSA). Pengamatan dilakukan setelah media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Proses selanjutnya diamati perubahan warna yang terjadi. Perubahan warna yang terjadi pada media MSA yaitu merah menjadi kuning yang menunjukkan bahwa bakteri mampu memfermentasi manitol.

11.3 Uji makroskopis pada media Agar darah. Pengujian ini dilakukan dengan cara menginokulasikan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dari hasil uji media MSA. Perubahan yang terjadi pada media agar darah yaitu adanya hemolysis pada sel darah dengaan adanya koloni berwarna putih dengan tepian koloni berwarna hijau. *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mempunyai tipe α-hemolitik yaitu melisis sel darah merah secara parsial akibat reduksi hemoglobin sehingga memperlihatkan warna kehijauan disekitar koloni.

11.4 Uji katalase. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengoleskan biakan murni *Streptococcus mutans* ATCC 25175 pada obyek glass, kemudian ditetesi dengan pereaksi H_2O_2 . Jika terbentuk gas berupa gelembung-gelembung udara pada pereaksi H_2O_2 maka hasil uji katalase adalah positif.

11.5 Uji koagulase. Pengujian ini dilakukan dengan memasukkan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dalam plasma sitrat, tahap selanjutnya diamati ada tidaknya gumpalan yang terbentuk. Jika terbentuk gumpulan maka hasil koagulase adalah positif bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

12. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air daun stevia

Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi untuk mengetahui ekstrak etanol atau fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun stevia. Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun stevia dibuat masing-masing tiga seri konsentrasi yaitu 10%, 20%, dan 40% dengan pengenceran yang sesuai. Disiapkan 3 cawan petri steril yang berisi 50 mL medium *Mueller Hinton Agar* (MHA). Semua medium diberi biakan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 secara perataan dengan kapas lidi steril, didiamkan sekitar 10 sampai 15 menit agar bakteri terdifusi

ke dalam medium. Tahap selanjutnya membuat 6 bagian pada cawan petri. Membuat cakram yang berisi bahan sampel dibuat dengan cara meneteskan larutan sampel sebanyak 30 μ L pada cakram sesuai konsentrasi. Bagian A diisi dengan cakram ekstrak etanol konsentrasi 10%, 20%, 40% pada masing-masing medium. Bagian B diisi dengan cakram fraksi *n*-heksan dengan konsentrasi 10%, 20%, 40% pada masing-masing medium. Bagian C diisi cakram fraksi etil asetat dengan konsentrasi 10%, 20%, 40%. Bagian D diisi dengan cakram fraksi air dengan konsentrasi 10%, 20%, 40% pada masing-masing medium. Bagian E diisi dengan kontrol negatif yaitu cakram DMSO 5%. Bagian F diisi dengan cakram ciprofloxacin 5 μ g sebagai kontrol positif. Semua cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Daya hambatan diukur dengan diameter daerah jernih yang teramatit sekitar cakram. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali replikasi. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi dilanjutkan dengan uji dilusi untuk mengetahui menentukan KHM dan KBM suatu antibakteri.

13. Identifikasi fraksi teraktif dengan KLT daun stevia

Fraksi teraktif dan baku pembanding rutin dilakukan identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk senyawa flavonoid. Sampel ditotolkan pada fase diam lempeng KLT silika gel GF 254, dengan fase gerak *n*-butanol : asam asetat : air (4:1:5). Noda pada UV 254 nm memberikan peredaman, UV 366 nm berfluoresensi biru, kuning, ungu gelap. Hasil positif berwarna kuning setelah disemprot sitroborat dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 menit (Fitriyani *et al.* 2011).

Fraksi teraktif daun stevia dan baku pembanding papaverin dilakukan identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada senyawa alkaloid. Sampel ditotolkan pada fase diam lempeng KLT silika gel GF 254. Fase gerak yang digunakan pada pengujian alkaloid adalah etil asetat : methanol:air (90:9:1), penyemprot pereaksi yang digunakan adalah dragendorf. Dragendorf merupakan penampak bercak spesifik untuk senyawa alkaloid. Reaksi positif mengandung alkaloid dengan adanya bercak berpendar berwarna kuning terang atau biru dibawah lampu UV 366 nm, pada UV 254 nm noda terlihat peredaman (Pratita 2017).

Fraksi teraktif dan baku pembanding glisirisin dilakukan identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada senyawa saponin. Sampel ditotolkan pada fase diam lempeng KLT silika gel GF 254 dan fase gerak fase gerak kloroform : methanol : air (6:3:1). Setelah itu bercak diamati pada UV 254 nm dan UV 366 nm.

Fraksi teraktif dan baku pembanding stigmasterol dilakukan identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada senyawa steroid. Sampel ditotolkan pada fase diam lempeng KLT silika gel GF 254 dan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (6:4). Hasil positif steroid ditunjukkan adanya penampakan noda setelah disemprot dengan *Lieberman Burchard* timbul noda berwarna ungu atau biru dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 menit (Fitriyani *et al.* 2011).

Identifikasi senyawa tanin dengan KLT digunakan plat silika GF 254. Fraksi teraktif dan baku pembanding asam galat ditotolkan pada lempeng pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusikan pada fase gerak *n*-butanol : asam asetat : air (4:1:5). Uji positif tanin menunjukkan peredaman pada UV 254 nm, UV 366 berfluoresensi biru dan lembayung, dan setelah disemprot pereaksi FeCl₃ noda berwarna hitam (Kusumo *et al.* 2017).

14. Pengujian aktivitas antibakteri daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni M.) secara dilusi

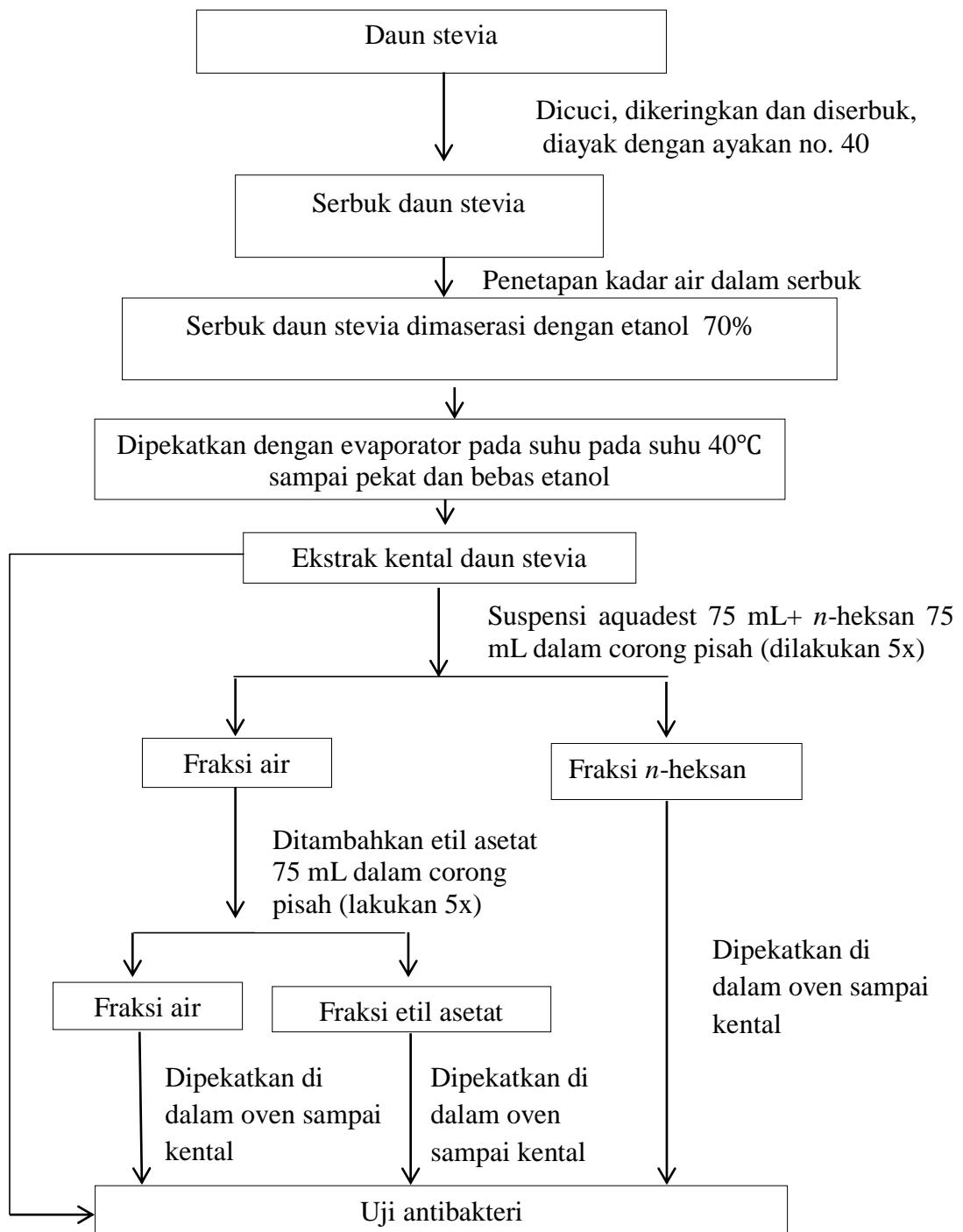
Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh dan menghambat bakteri uji. Metode dilusi menggunakan 12 tabung steril. Pembuatan larutan stok ekstrak etanol atau fraksi teraktif menggunakan pelarut yang sesuai. Secara aseptis dari larutan stok tersebut dibuat deret konsentrasi yaitu kontrol (-), 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625 %; 0,3125 %; 0,1563 %; 0,078% dan kontrol (+). Kontrol positif menggunakan suspensi bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175 pada tabung terakhir dan kontrol negatif menggunakan fraksi etil asetat 40%. Tabung 1 diisi dengan senyawa uji yaitu fraksi etil asetat 40% 1 mL. Tabung 2 diisi dengan fraksi etil asetat 0,5 mL. Tabung 3 diisi fraksi etil asetat sebanyak 0,5 mL. Secara aseptik media *Brain Heart Infusion* (BHI) dimasukkan 0,5 mL pada tabung ke 3 sampai tabung ke 11. Pada tabung 3 divorteks, dipipet sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan dalam tabung 4, tabung 4 divorteks kemudian dipipet 0,5 mL dimasukkan pada tabung 5. Tabung

5 divorteks, dipipet sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan dalam tabung 6 begitu seterusnya sampai tabung ke 11. Ambil 0,5 mL dari tabung ke 11 kemudian dibuang. Tahap selanjutnya yaitu dari tabung 2 sampai tabung 11 diisi dengan 0,5 mL suspensi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tabung 12 diisi dengan 1 mL suspensi bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 sebagai kontrol positif. Tahap terakhir yaitu seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengujian dilakukan secara aseptis dan direplikasi sebanyak 3 kali.

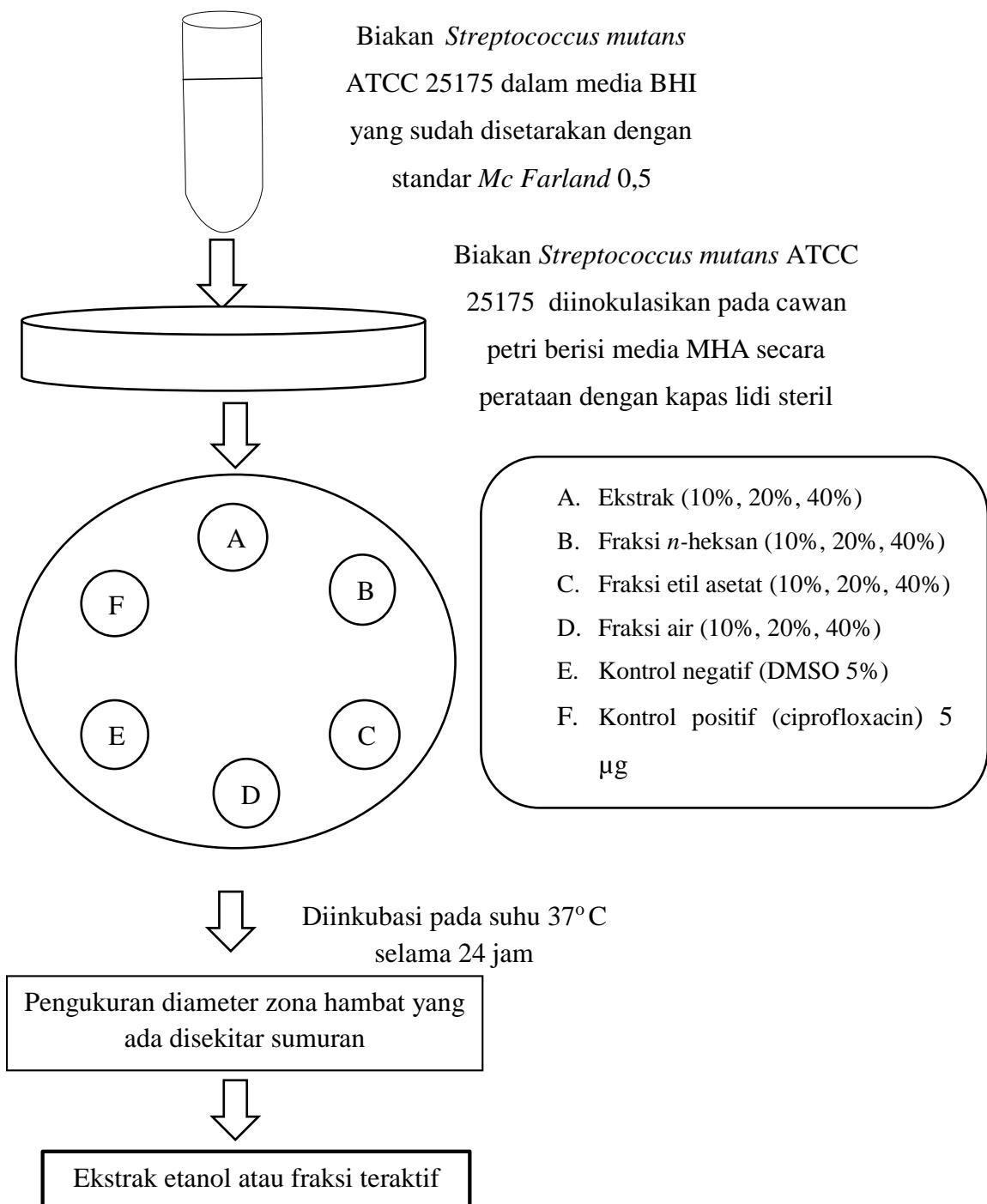
Menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu batas terendah tabung media yang jernih atau yang memberikan hasil negatif. Menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan cara seluruh tabung diinokulasikan secara goresan pada media agar darah untuk masing-masing larutan uji. Proses selanjutnya dengan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Mengamati ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media agar darah yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

E. Analisis Data

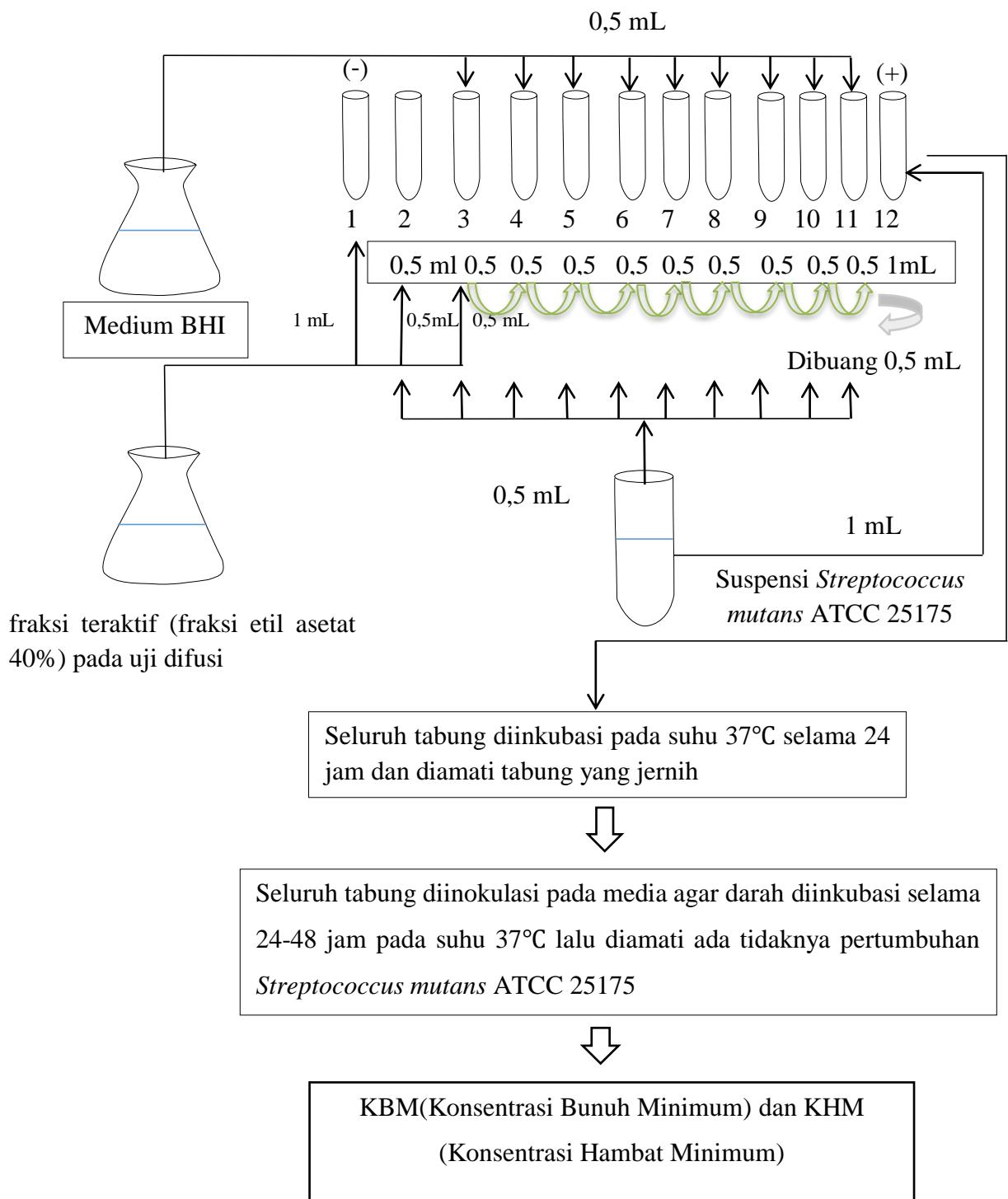
Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi etil asetat terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 secara difusi dinyatakan dengan nilai zona hambat. Data yang diperoleh dianalisa menggunakan *Kolmogorov-Smirnov*, jika terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan analisa menggunakan metode statistik *One Way Anova*.



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertonii M.)



Gambar 2. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak daun stevia terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan metode difusi



Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif (fraksi etil asetat 40%) dari ekstrak daun stevia terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan metode dilusi.