

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 dan dikumpulkan pada bulan Januari 2019.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kucai yang diambil secara acak. Daun kucai dalam kondisi yang masih segar, tidak busuk, belum berubah warna, dan bersih dari kotoran yang diperoleh dari Kelompok Tani Gondosuli, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah dan dikumpulkan pada bulan Januari 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah ekstrak etanol dari daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.).

Variabel utama kedua adalah fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun kucai.

Variabel utama ketiga adalah aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol terhadap daun kucai dengan metode difusi dan dilusi.

Variabel utama keempat adalah fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif berdasarkan diameter zona hambat yang paling besar.

Variabel utama kelima adalah uji aktivitas antibakteri dari fraksi teraktif dengan metode difusi dan dilusi terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

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 kendali.

Variabel bebas adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti berpengaruh terhadap variabel tergantung, variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun kucai.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung pada penelitian ini berupa pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada kekeruhan media yang dipengaruhi oleh fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun kucai.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel tergantung seperti uji kemurnian *Streptococcus mutans* ATCC 25175, kondisi laboratorium meliputi kondisi inkas, alat bahan yang digunakan harus steril serta media yang digunakan dalam penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kucai adalah daun dari tanaman kucai yang diperoleh dari salah satu Kelompok Tani Gondosuli, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah dengan kondisi yang segar dan belum layu.

Kedua, serbuk daun kucai adalah daun kucai yang diambil kemudian dicuci untuk membersihkan kotoran yang masih menempel, setelah itu dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 50°C selama 5 hari, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun kucai adalah hasil ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% yang kemudian dipekatkan.

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

Kelima, fraksi etil asetat daun kucai adalah hasil fraksinasi dari residu *n*-heksana menggunakan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air daun kucai adalah hasil fraksinasi dari residu *n*-heksana menggunakan pelarut air.

Ketujuh, bakteri uji pada penelitian ini adalah *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, metode difusi adalah dengan sumuran yang berisi larutan uji *n*-heksana, larutan uji etil asetat, larutan uji air dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, kontrol positif (Ciprofloxacin) dan kontrol negatif (DMSO 5%).

Kesembilan, metode dilusi adalah metode uji aktivitas antibakteri dengan membuat satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,562%, 0,781%, 0,391%, 0,195%, dan 0,098%. Kontrol positif adalah suspensi bakteri dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kontrol negatif adalah konsentrasi fraksi etil asetat daun kucai.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

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

1.2. Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Streptococcus mutans* ATCC 25175 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

1.3. Media. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Manitol Salt Agar* (MSA), dan Agar Darah.

1.4. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, *n*-heksana, etil asetat, air, aquadestilata steril, pereaksi H₂O₂, asam sulfat pekat, reagen Wagner, reagen Dagrendoff, pereaksi Libermen Bouchardat (LB), asam asetat, amonia, kloroform, *n*-butanol, FeCl₃, timbal asetat 10%, magnesium stearat, cat kristal violet, larutan lugol iodine, cat safranin dan antibiotik ciprofloxacin.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, alat penyerbuk, pengayak nomor 40, botol coklat, *moisture balance*, *sterling-bidwell*, timbangan analitik, cakram, alat *Rotary Evaporator*, gelas ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, cawan penguap, corong pisah, kain flanel, pipet tetes, corong kaca, *waterbath*, kertas saring, autoklaf, objek glass, deck glass, inkubator, lampu spiritus, pipet volume, ose platina, pinset, plat KLT silika gel GF₂₅₄, dan mikroskop.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian, melakukan determinasi tanaman kucai (*Allium schoenoprasum* L.) yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Biologi, Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengambilan bahan baku daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

Daun kucai diambil dari Kelompok Tani Gondosuli, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Ciri-ciri daun hijau segar, tidak terlalu tua, dan tidak terlalu muda serta bebas dari hama. Daun kucai dicuci terlebih dahulu dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran dan cemaran. Setelah itu, dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 5 hari.

3. Pembuatan serbuk daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

Daun kucai yang telah kering diserbuk dengan cara diblender, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40, sehingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan yang diinginkan. Hasil dari pembuatan serbuk kemudian dikeringkan disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat, yang selanjutnya akan digunakan untuk penelitian.

4. Penetapan kadar susut pengeringan serbuk daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

Penetapan susut pengeringan daun kucai dilakukan dengan alat *moisture balance* pada suhu 105°C, caranya dengan menimbang 1 sampai 2 gram simplisia dalam botol timbang dangkal tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu penetapan dan ditara. Ratakan bahan dalam botol timbang dengan bahan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol, dimasukkan dalam ruang pengering, buka tutupnya, ditunggu sampai alat *moisture balance* berbunyi yang menandakan hasil analisa telah selesai. Susut pengeringan akan memenuhi syarat apabila kadar air suatu serbuk simplisia tidak lebih dari 10% (DepKes RI 2008).

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

Penetapan kadar air pada penelitian ini menggunakan metode destilasi dengan alat *Sterling-Bidwell*. Prosedurnya yaitu, tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan asam pencuci, bilas dengan air, kemudian dikeringkan dalam lemari pengering. Bahan ditimbang sebanyak 20 gram, dimasukkan kedalam labu kering. Batu didih dimasukkan ke dalam labu ukur untuk mengurangi gejala mendadak saat mendidih. Toluene jenuh air dimasukkan kedalam labu kurang lebih 200 ml, kemudian pasang rangkaian alat. Panaskan labu hati-hati hingga semua air terdestilasi atau air pada penampung tidak bertambah lagi. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluene jenuh air sambil dibersihkan dengan sikat yang telah dibasahi dengan toluene 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 toluene jenuh air hingga tetesan air turun. Volume air pada penampung dibaca setelah air dan toluene terpisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (DepKes RI 2000).

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

6. Pembuatan ekstrak daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

Serbuk daun kucai 1000 gram dimasukkan dalam bejana lalu ditambahkan etanol 70% 7,5 liter. Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojok kemudian disaring dengan kain flanel dan ampas diperas. Filtrat dan ampas dipisahkan. Filtrat dimasukkan ke dalam bejana yang baru, ampas ditambahkan etanol 70% secukupnya ke dalam bejana yang lama, sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Bejana ditutup, dibiarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya, selama 2 hari. Ampas disaring dengan kain flanel kemudian diperas. Filtrat dan ampas dipisahkan. Filtrat yang baru dicampurkan menjadi satu dengan filtrat yang sebelumnya. Filtrat dipekatkan dengan *Rotary Evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental (DepKes RI 2008).

Penetapan persen rendemen diperoleh dari hasil ekstrak pekat kemudian hasil ekstrak pekat dibagi dengan berat serbuk daun kucai kemudian dikalikan 100%.

$$\text{Randemen (\%)} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot serbuk}} \times 100\%$$

7. Fraksinasi daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang 10 gram ekstrak daun kucai kemudian dilarutkan dengan pelarut air 75 ml, dilakukan 6 kali pengocokan dengan pelarut *n*-heksana masing-masing 75 ml, dalam proses fraksinasi dengan corong pisah. Fase *n*-heksana terletak di atas dan fase air terletak di bawah. Fraksi *n*-heksana yang didapat dipekatkan dengan oven pada suhu 50°C. Residu yang didapat dari fraksi *n*-heksana dilanjutkan 6 kali pengocokan dengan pelarut etil asetat masing-masing 75 ml. Fraksinasi dilakukan sebanyak 5 kali replikasi. Hasil didapat adalah fraksi etil asetat yang terletak di atas dan fraksi air yang di bawah kemudian dipekatkan dengan oven pada suhu 50°C sampai pekat lalu ditimbang (Harbone 1987).

8. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

8.1. Saponin. Ekstrak sebanyak 2 mg dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa

ditambahkan 2 tetes HCl 1 N dan dibiarkan selama 10 menit, bila busa yang terbentuk bisa tetap stabil maka ekstrak positif mengandung saponin (Hayati *et al.* 2013).

8.2. Triterpenoid. Ekstrak sebanyak 2 mg 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).

8.3. Tanin. Ekstrak sebanyak 2 mg dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 1 mL larutan FeCl₃ 10%. Jika terbentuk warna biru tua, biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin (Simaremare 2014).

8.4. Flavonoid. Ekstrak sebanyak 2 mg dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1–2 mL air panas 50 %, kemudian ditambah logam Mg dan 0,5 mL HCl pekat, dan amil alkohol. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk pada lapisan amil alkohol, menunjukkan adanya flavonoid (Indrayani *et al.* 2006).

8.5. Alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan ekstrak 2 mg dalam 1 ml HCl 2 N dan 9 ml aquadest, kemudian dipanaskan selama 2 menit dan didinginkan. Filtrat yang diperoleh merupakan larutan uji untuk pereaksi Wagner, Dragendorf dan Mayer. Keberadaan alkaloid dalam sampel ditunjukkan dengan terbentuknya endapan coklat sampai hitam pada pereaksi Wagner, endapan jingga coklat pada pereaksi Dragendorf dan adanya endapan putih setelah diberi pereaksi Mayer (Harbone 1987).

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

Ekstrak diuji etanolnya untuk mengetahui ekstrak daun kucai benar-benar bebas dari etanol. Jika masih mengandung etanol dikhawatirkan etanol dapat menghambat pertumbuhan bakteri, karena etanol mempunyai kemampuan membunuh bakteri. Pemeriksaan bebas etanol dalam ekstrak daun kucai dilakukan

dengan cara ekstrak ditambah dengan H_2SO_4 lalu ditambah lagi dengan CH_3COOH , lalu panaskan. Hasil uji positif bila tidak tercium bau khas ester (Kurniawati 2015).

10. Sterilisasi alat

Alat seperti gelas ukur, tabung reaksi, pipet ukur, batang pengaduk, cawan petri, dan beaker glass kemudian dibungkus dengan kertas dan disterilkan dengan oven pada suhu $170\text{--}180^\circ\text{C}$ selama 1 jam, jarum ose disterilkan dengan pemanas api langsung. Medium yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan mencapai 2 atm.

11. Pembuatan media

11.1. Pembuatan media *Brain Heart Infusion* (BHI). BHI ditimbang sebanyak 37 gram dimasukkan dalam beaker glass, kemudian ditambahkan aquadestilata steril sampai volume 1000 mL. Medium dihomogenkan dengan pemanasan dan dituangkan dalam tabung reaksi 10 mL. Tabung ditutup dengan kapas, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan mencapai 2 atm. Medium dibiarkan dingin, kemudian disimpan dalam lemari es.

11.2. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Media MHA ditimbang sebanyak 38 gram dimasukkan dalam beaker glass, kemudian ditambahkan aquadestilata steril sampai volume 1000 mL. Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan mencapai 2 atm, kemudian disimpan dalam lemari es.

11.3. Pembuatan media *Manitol Salt Agar* (MSA). Media MSA ditimbang sebanyak 111 gram dimasukkan dalam beaker glass, kemudian ditambahkan aquadestilata 1000 ml dan dididihkan sampai larut. Medium di sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan mencapai 2 atm, kemudian disimpan dalam lemari es.

11.4. Pembuatan media *Agar Darah*. Media Agar Darah ditimbang sebanyak 38 gram dimasukkan dalam beaker glass, kemudian ditambahkan aqua destilata steril sampai volume 1000 mL. Medium disterilisasi dengan autoklaf

pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan mencapai 2 atm, kemudian ditambahkan darah domba sebanyak 5% (50 mL). Medium dibiarkan memadat, kemudian disimpan dalam lemari es.

12. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dalam biakan murni diambil 1 ose steril, kemudian dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril yang sudah berisi 5 ml *Brain Heart Infusion* (BHI), diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Tingkat kekeruhan bakteri disetarakan dengan standar Mc Farland 0,5 setara dengan standar $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, jika belum sesuai diinkubasi pada suhu 37°C sampai kekeruhannya sesuai dengan standar Mc Farland 0,5 selama 24 jam, dilakukan pengenceran 1:1000.

13. Identifikasi bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175

13.1. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Identifikasi mikroskopis bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Pertama dibuat apusan diatas objek glass, kemudian difiksasi. Selanjutnya ditetesi dengan perwarna Gram A yang berisi Kristal violet selama 1 menit, lalu dicuci dan dilanjutkan tetesi dengan perwarna Gram B yang berisi lugol iodine sebagai mordant selama 1 menit. Setelah itu cuci kembali dan lanjutkan dengan tetesi perwarna Gram C sebagai peluntur selama 30 detik kemudian dicuci kembali. Terakhir ditetesi dengan perwarna Gram D yang berisi safranin selama 1 menit kemudian dicuci dan dikeringkan, setelah kering amati dengan mikroskop. Jika didapat hasil berbentuk coccus dan berwarna violet maka hasil pewarnaan adalah Gram positif bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

13.2. Identifikasi makroskopis. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dari biakan murni kemudian dimasukkan pada media *Manitol Salt Agar* (MSA) dan dikultur pada media Agar Darah. Pengamatan dilakukan dengan setelah media diinkubasi selama 18-14 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Perubahan warna yang terjadi pada media MSA yaitu dari merah menjadi kuning dan perubahan yang terjadi pada media Agar Darah yaitu adanya

hemolisis pada sel darah merah dengan adanya koloni berwarna putih dengan tepian koloni berwarna hijau.

13.3. Uji katalase. Uji katalase dilakukan dengan ditambahkan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% pada gelas obyek 2 yang bersih. Biakan dioleskan pada gelas obyek yang sudah ditetesi hidrogen peroksida. Suspensi dicampur secara perlahan, hasil yang positif ditandai oleh terbentuknya gelembung-gelembung udara (Hadioetomo 1990).

13.4. Uji koagulase. Uji koagulase dilakukan dengan dimasukkan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dalam plasma sitrat, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, selanjutnya diamati ada tidaknya gumpalan yang terbentuk. Jika terbentuk gumpalan maka hasil uji koagulase adalah positif bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

14. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)

14.1. Uji aktivitas antibakteri metode difusi ekstrak tenol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun kucai. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi untuk mengetahui fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun kucai. Metode difusi cakram dilakukan dengan cara suspensi bakteri uji *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dioleskan secara merata pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan menggunakan kapas lidi steril, kemudian didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Media tersebut dibuat 6 bagian untuk menempatkan cakram. Masing-masing cakram diisi 30µl larutan stok ekstrak; fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air; DMSO 5% sebagai kontrol negatif dengan menggunakan mikropipet, ciprofloxacin 5µg sebagai kontrol positif. Konsentrasi ekstrak dan fraksi dalam tiap petri masing-masing 50; 25; dan 12,5%. Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, diamati hasil dan diukur diameter zona hambat sekitar cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri sekitar menandakan bahwa kandungan kimia daun kucai memiliki daya hambat terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi selanjutnya

dilakukan uji statistik untuk mengetahui konsentrasi diameter daya hambat terbesar antar fraksi, setelah didapatkan fraksi teraktif pengujian dilanjutkan dengan metode dilusi.

14.2. Uji aktivitas antibakteri metode dilusi ekstrak tenol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun kucai. Pengujian antibakteri untuk fraksi teraktif dilakukan dengan metode dilusi. Metode dilusi ini untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Pengujian antibakteri ini dilakukan dengan menyiapkan 12 tabung steril. Pembuatan larutan stok fraksi teraktif menggunakan DMSO 5%. Konsentrasi pengenceran masing-masing tabung 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,391; 0,195; dan 0,098%. Metode ini dilakukan secara aseptis dengan cara menyiapkan 12 tabung steril. Tabung pertama ditambahkan 1 ml fraksi teraktif sebagai kontrol negatif dan tabung keduabelas hanya berisi 1 ml larutan suspensi bakteri sebagai kontrol positif. Tabung kedua berisi fraksi teraktif 0,5 ml dan tabung ketiga berisi fraksi teraktif 0,5 ml dan medium BHI 0,5 ml. Medium BHI diisi dari 0,5 ml dari tabung tiga sampai sebelas lalu tabung kedua dikocok kemudian diambil 0,5 ml dimasukkan kedalam tabung tiga, dari tabung tiga diambil 0,5 ml dimasukkan tabung empat dan begitu seterusnya sampai tabung sebelas. Ambil 0,5 ml dari tabung kesebelas kemudian dibuang. Suspensi bakteri uji dalam medium BHI yang telah disiapkan dimasukkan pada tabung kedua sampai tabung sebelas sebanyak 0,5 ml kecuali tabung keduabelas sebanyak 1 ml sebagai kontrol positif. Terakhir semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dan diamati kekeruhannya Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dari goresan bakteri sudah tidak terdapat pertumbuhan bakteri.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan mengamati hasil biakan mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba). Konsentrasi bunuh Minimum (KBM) diketahui dengan cara menggoreskan larutan dari tabung yang hasilnya jernih pada medium Agar darah dan diinkubasi selama 24-48 jam. Setelah 24-48 jam diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada daerah goresan.

15. Identifikasi golongan senyawa kimia fraksi teraktif dengan KLT

15.1. Saponin. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah campuran homogen lapisan bawah pelarut antara kloroform : metanol : aquades (13:7:2). Pengamatan noda menggunakan lampu UV 254 dan 366 nm. Lempeng juga di semprotkan dengan pereaksi LB dan dipanaskan pada suhu 110°C selama 10 menit untuk memperjelas warna noda. Setelah penyemprotan dengan pereaksi Liebermen-Burchard yang dilanjutkan dengan pemanasan diperoleh bercak warna hijau. Baku pembanding yang digunakan adalah glisirisin (Suharto *et al.* 2012).

15.2. Triterpenoid. Sampel dilarutkan dengan sedikit pelarutnya, kemudian ditotolkan pada plat KLT silika gel GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah campuran kloroform : metanol (9:1), kemudian dilihat dibawah sinar UV 254 nm, sinar UV 366 nm dan disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Reaksi positif yang terbentuk terdapat bercak berwarna hijau biru dan berfluoresensi hijau di sinar UV 366. Baku pembanding yang digunakan adalah stigmasterol (Yuda *et al.* 2017).

15.3. Tanin. Fase diam yang digunakan silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah n-butanol : kloroform : air (4:1:5). Pengamatan noda menggunakan sinar UV 245 nm, UV 366 nm dan dengan penampak noda Pereaksi FeCl₃. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna hitam. Baku pembanding yang digunakan adalah asam galat (Sari *et al.* 2015).

15.4. Flavonoid. Sampel dan baku pembanding rutin ditotolkan pada fase diam silika gel GF₂₅₄, lalu dielusi dengan fase gerak asam asetat glacial : n-butanol : air (1:4:5), dengan penampak noda pereaksi Sitroborat dengan pemanasan pada suhu 105°C selama 5 menit, setelah disemprot berwarna kuning. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna kuning cokelat setelah diuapi ammonia pada pengamatan dengan sinar tampak, meredam di bawah sinar UV 254 nm, berfluoresensi biru pada UV 366 nm menegaskan adanya kandungan flavonoid (Yuda *et al.* 2017).

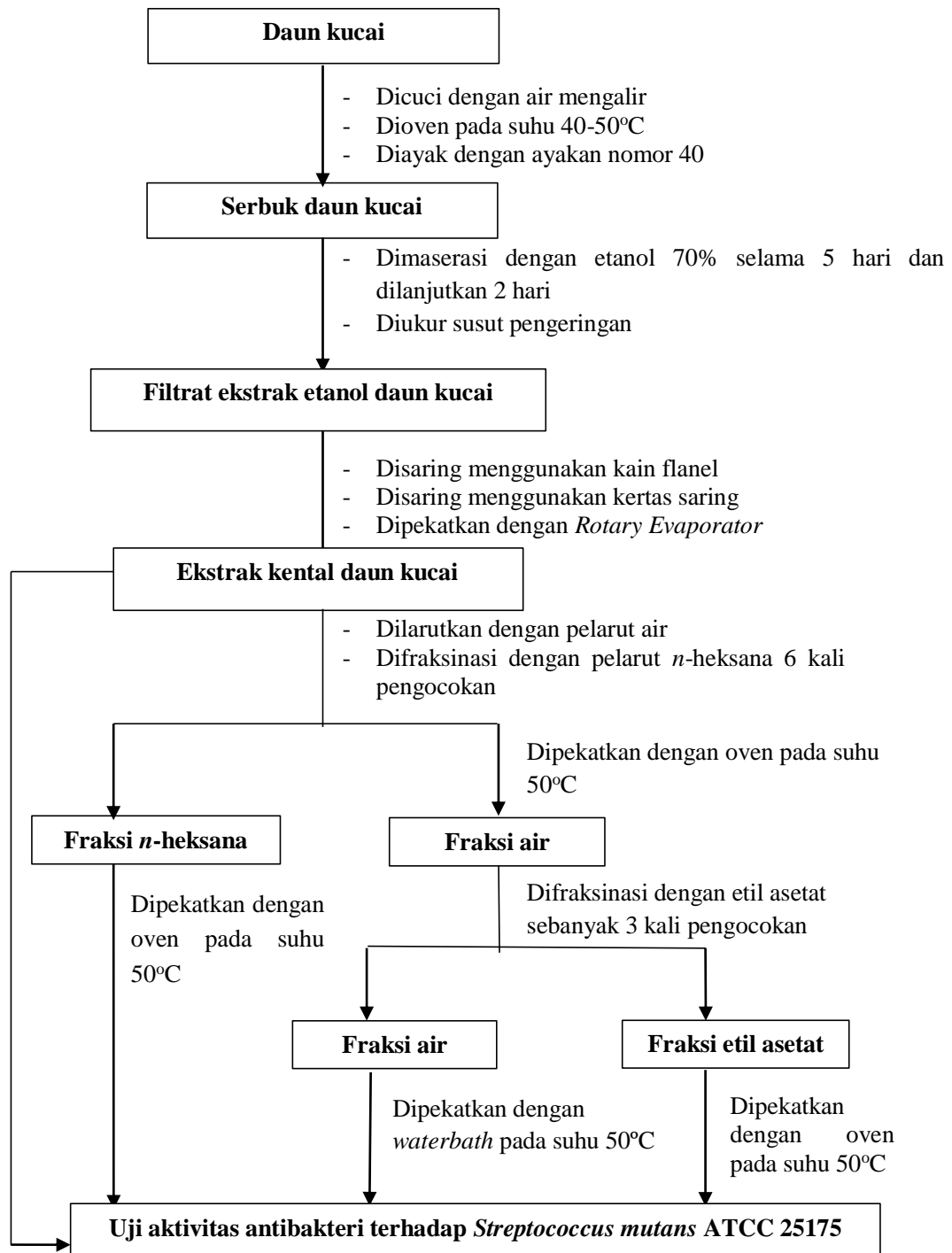
15.5. Alkaloid. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah campuran etil asetat : metanol : air (16:1:2), noda

diamati menggunakan sinar UV 254 dan sinar UV 366 nm kemudian deteksi bercak dengan menyemprot pereaksi Dragendorf. Bercak yang menandakan adanya alkaloid adalah bercak dengan warna coklat atau jingga pada sinar tampak, terjadi peredaman pada sinar UV 254 nm dan berfluoresensi biru atau kuning pada sinar UV 366 nm.. Baku pembanding yang digunakan adalah papaverin (Depkes 1989).

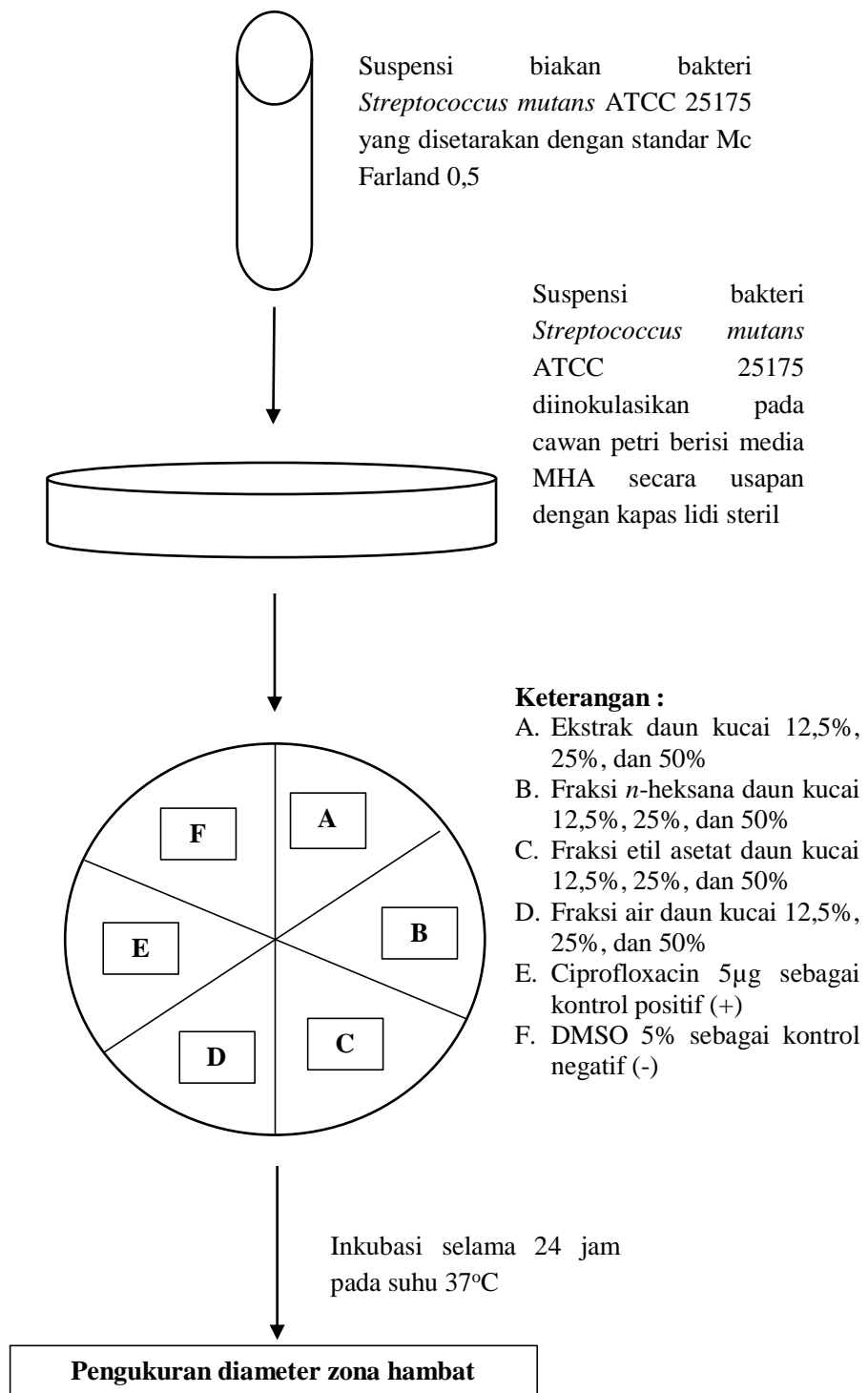
E. Analisis Hasil

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.) terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 menggunakan metode difusi yang dinyatakan dengan nilai zona hambat yang terbentuk. Hasil data yang diperoleh dianalisis menggunakan metode *One-way* ANOVA.

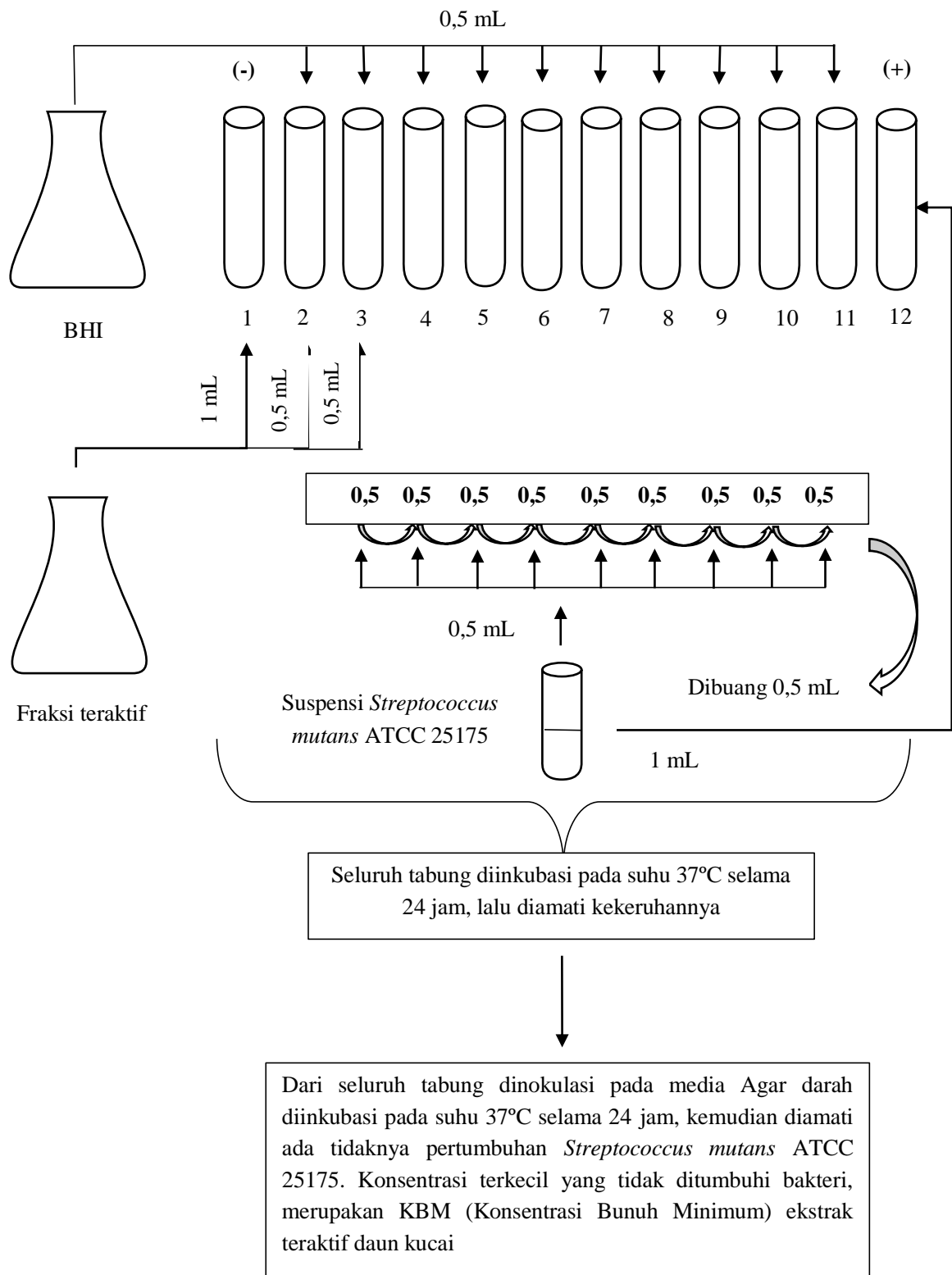
F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun kucai (*Allium schoenoprasum* L.)



Gambar 4. Pengujian Aktivitas Antibakteri Fraksi *n*-heksana, Fraksi Etil Asetat, Fraksi Air dan Ekstrak Etanol dari Ekstrak Daun Kucai Terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 Menggunakan Metode Difusi.



Gambar 5. Skema Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak, Fraksi *n*-heksana, Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Air dari Ekstrak Daun Kucai Terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dengan Metode Dilusi.