

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang menjadi subjek penelitian ini adalah buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang diperoleh dari B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional) Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, pada bulan Agustus tahun 2022.

2. Sampel

Sampel yang diambil untuk penelitian ini adalah buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang sudah setengah matang. Pengambilan sampel dilakukan secara acak, dengan syarat bahwa buah yang dipilih dalam kondisi masih baik dan tidak busuk..

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel penelitian

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dari buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.).

Variabel utama kedua adalah fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air yang diambil dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.).

Variabel utama ketiga adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, yang diuji menggunakan metode difusi dan dilusi.

2. Identifikasi variabel utama

Variabel utama telah diidentifikasi terlebih dahulu dan dibagi menjadi beberapa jenis variabel, termasuk variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang dapat diubah atau dimanipulasi untuk memahami pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Dalam penelitian ini, variabel bebas adalah fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air yang diambil dari ekstrak buah belimbing wuluh.

Variabel tergantung adalah titik fokus utama yang diamati dalam penelitian. Dalam penelitian ini, variabel tergantung adalah

pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dalam media yang mungkin dipengaruhi oleh fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air. Penilaian melibatkan fraksi teraktif, daya hambat, dan daya bunuh terhadap bakteri tersebut.

Variabel terkendali adalah variabel yang dijaga agar konsisten dan seragam di seluruh perlakuan. Variabel ini dapat memengaruhi variabel tergantung. Dalam penelitian ini, variabel terkendali mencakup hal seperti kemurnian bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kondisi laboratorium, peralatan dan bahan yang digunakan, jenis media yang digunakan, metode seleksi buah, serta metode ekstraksi dan fraksinasi. Semua variabel terkendali diatur dan dijaga agar hasil penelitian dapat konsisten dan dapat diandalkan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, bagian buah belimbing wuluh yang digunakan adalah yang setengah matang, masih dalam keadaan segar, bebas dari kerusakan, dan dipilih secara acak dari B2P2TOOT.

Kedua, serbuk simplisia buah belimbing wuluh dihasilkan dengan mengeringkannya dalam oven pada suhu 40°C, lalu menjalani proses penghancuran menggunakan mesin pencacah dan penyaringan dengan ukuran *mesh* 40.

Ketiga, ekstrak buah belimbing wuluh diperoleh melalui metode maserasi, menggunakan etanol 96% sebagai pelarut ekstraksi.

Keempat, fraksi buah belimbing wuluh merupakan hasil dari membagi bagian buah setengah matang yang masih dalam keadaan segar dan bebas dari kontaminasi menjadi beberapa bagian. Proses pembagian ini menggunakan pelarut berbeda, yaitu *n*-heksana, etil asetat, dan air.

Kelima, fraksi *n*-heksana adalah fraksi yang dihasilkan dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh setelah mengalami proses fraksinasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana yang bersifat non polar.

Keenam, fraksi etil asetat merupakan fraksi yang dihasilkan dari residu cairan yang diperoleh setelah proses fraksinasi fraksi *n*-heksana. Fraksi etil asetat menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar.

Ketujuh, fraksi air adalah residu yang diperoleh dari proses fraksinasi ekstrak etil asetat dengan menggunakan pelarut air yang bersifat polar.

Kedelapan, bakteri yang digunakan sebagai subjek uji dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, yang telah diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kesembilan, Metode difusi adalah prosedur yang digunakan untuk menentukan fraksi yang paling aktif dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air. Kontrol positif menggunakan amoksisilin, sementara kontrol negatif menggunakan DMSO 5%, dengan konsentrasi masing-masing sebesar 20%, 10%, dan 5%.

Kesepuluh, Metode dilusi adalah cara untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Ini melibatkan pembuatan seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi, yakni 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39%. Kontrol positif adalah suspensi bakteri dalam medium *Brain Heart Infusion* (BHI), sementara kontrol negatif adalah konsentrasi fraksi etil asetat buah belimbing wuluh.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan antara lain labu Erlenmeyer, *water bath*, *chamber*, *autovortex mixer*, *beaker glass*, inkas, bejana maserasi, *rotary evaporator*, *Sterling Bidwell*, corong pisah, pipet volume, kertas saring, penggaris, kertas label, *object glass*, jarum ose, mikropipet, *vial*, inkubator, autoklaf, corong kaca, gelas ukur, neraca analitik, spidol, desikator, piknometer, kapas lipid steril, kain *flannel*, cawan petri, pinset, rak dan tabung reaksi, stirrer magnetic, jangka sorong, ayakan *mesh* 40, mikropipet, *slindercup*, *triangle* dan alat pencacah.

2. Bahan

2.1 Bahan Sampel. Sampel yang digunakan adalah buah belimbing wuluh yang telah mencapai tahap setengah matang, kondisinya adalah bersih, segar, dan tidak mengalami kerusakan atau pembusukan.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini meliputi etanol 96%, *n*-heksana, dan etil asetat, aquadest, hydrogen peroxida, pereaksi Mayer, kalium telurit 1%, *Liebermann Burchard*, larutan sitroborat, larutan *Dragendorff*, aseton, kristal violet, larutan FeCl_3 1%, lugol iodine, plasma darah, amil alkohol, H_2SO_4

pekat, serbuk Mg, asam asetat pekat, safranin, HCl pekat dan antibiotik amoksisilin.

2.3 Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Morfologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2.4 Medium. Medium yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Mannitol Salt Agar* (MSA) dan *Brain Heart Infusion* (BHI).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tahapan determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di Karanganyar, Jawa Tengah. Proses determinasi tanaman bertujuan untuk mencocokkan ciri-ciri morfologis, makroskopis dan mikroskopis dari buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) agar sesuai dengan karakteristiknya.

2. Pembuatan serbuk buah belimbing wuluh

20 kg buah belimbing yang telah dipilih dengan teliti kemudian dibersihkan dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang mungkin menempel pada permukaannya. Setelah itu, buah belimbing tersebut dijemur di bawah sinar matahari dan ditutup dengan kain. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air dalam buah belimbing, sehingga mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri.

Setelah proses pengeringan selesai, buah belimbing yang telah menjadi simplisia kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan menggunakan ayakan berukuran *mesh* 40. Proses pengayakan bertujuan untuk mendapatkan serbuk simplisia yang lebih halus dan siap digunakan dalam proses selanjutnya.

3. Pembuatan ekstrak etanol buah belimbing wuluh

Pertama-tama, ambil 800 gram serbuk buah belimbing wuluh yang telah dipersiapkan, dan tempatkan serbuk tersebut dalam sebuah wadah. Setelah itu, tambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 8 liter ke dalam wadah yang berisi serbuk buah belimbing wuluh. Pastikan pelarut merata menutupi serbuk buah. Selanjutnya, rendam campuran serbuk buah dan pelarut ini selama sekitar 6 jam pertama. Sesekali, aduk atau gojog campuran ini agar pelarut dapat meresap secara merata

ke dalam serbuk buah. Setelah proses perendaman pertama, biarkan campuran selama 18 jam tambahan tanpa campur tangan. Hal ini memungkinkan pelarut untuk mengekstrak senyawa-senyawa dari buah belimbing wuluh. Setelah masa perendaman kedua selesai, lakukan proses filtrasi. Tujuannya adalah memisahkan cairan (maserat) dari bahan padat (ampas) yang terkandung dalam campuran. Ampas ini dapat disaring dengan menggunakan kain flannel atau penyaring lain yang sesuai. Ampas yang telah disaring kemudian dapat digunakan dalam proses remaserasi. Tambahkan kembali 4 liter pelarut etanol 96% ke dalam ampas yang telah disaring. Rendam campuran ini selama 6 jam pertama dengan sesekali pengadukan, kemudian biarkan selama 18 jam. Setelah remaserasi selesai, saring filtrat (cairan hasil proses ekstraksi) sekali lagi untuk memisahkan ampas dari maserat. Langkah terakhir adalah pemekatan filtrat. Proses pemekatan ini dapat dilakukan menggunakan rotary evaporator dengan suhu sekitar 40°C. Ini akan membantu menghilangkan sebagian pelarut dan meningkatkan konsentrasi senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Untuk mendapatkan ekstrak yang lebih kental, filtrat yang sudah mengalami pemekatan dapat diuapkan lebih lanjut dengan menggunakan waterbath atau alat lain yang sesuai (Kemenkes RI., 2013).

4. Karakterisasi serbuk dan ekstrak buah belimbing wuluh

4.1 Penetapan susut pengeringan serbuk. Untuk menentukan kadar susut pengeringan, langkah-langkah yang diikuti mengacu pada pedoman yang disebut Farmakope Herbal Indonesia (FHI). Proses ini dimulai dengan mengambil 1-2 gram serbuk yang akan dianalisis, kemudian serbuk tersebut dimasukkan ke dalam sebuah botol timbang yang telah ditimbang sebelumnya. Serbuk tersebut kemudian diratakan dalam botol dengan cara menggoyangkan botol dengan lembut hingga membentuk lapisan serbuk dengan ketebalan sekitar 5-10 mm. Setelah serbuk merata dalam botol, pastikan botol tersebut tertutup dengan baik. Selanjutnya, botol dengan serbuk dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C dan dipanaskan hingga mencapai bobot konstan, yang ditandai ketika beratnya tidak lebih dari 10% dari berat awalnya. Langkah ini digunakan untuk menghitung kadar susut pengeringan serbuk tersebut. (Kemenkes RI, 2017).

4.2 Penetapan kadar air ekstrak. Kadar air dalam penelitian ini ditentukan menggunakan metode gravimetri. Langkah pertama melibatkan penimbangan 10 gram ekstrak etanol buah belimbing

wuluh. Ekstrak tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kurs yang telah dipanaskan sebelumnya di dalam oven pada suhu 105°C dan telah ditara (dikalibrasi). Selanjutnya, ekstrak dibiarkan di dalam kurs dan di oven pada suhu 105°C selama 5 jam. Setelah proses pengeringan selama 5 jam, dilakukan penimbangan ekstrak. Proses pengeringan ekstrak dilanjutkan dengan selang waktu 1 jam antara dua penimbangan berturut-turut hingga diperoleh bobot yang konstan. Kadar air dihitung dengan membandingkan berat awal dan berat akhir ekstrak pada kondisi tersebut, dan kadar air yang diukur harus kurang dari 0,25% dari berat total ekstrak. (Kemenkes RI, 2017).

5. Uji bebas etanol

Pengujian yang disebut esterifikasi digunakan untuk memverifikasi apakah ekstrak tersebut telah bebas dari etanol dan masih mempertahankan aktivitas antibakterinya (Raymon *et al.*, 2016). Dalam pengujian ini, 2 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 2 tetes asam sulfat pekat serta 5 tetes asam asetat. Tabung reaksi kemudian ditutup dengan menggunakan kapas. Untuk menganggap bahwa ekstrak telah bebas dari etanol, tidak boleh terdeteksi bau ester pada kapas setelah proses ini selesai.

6. Fraksinasi

Pada tahap fraksinasi, 10 gram ekstrak etanol buah belimbing wuluh dicampur dengan 5 ml etanol untuk meningkatkan kelarutannya. Kemudian, campuran tersebut disuspensikan dalam 70 ml air suling (aquadest). Proses selanjutnya melibatkan partisi ekstrak dengan 75 ml *n*-heksana, dengan pengadukan menggunakan corong pisah yang diulangi sebanyak tiga kali. Lapisan *n*-heksana yang terbentuk diambil dan dipekatkan menggunakan vacuum rotary evaporator hingga kering. Hasil dari proses ini disebut fraksi etil asetat. Fraksi air diperoleh dengan menguapkan air yang tersisa setelah proses partisi di atas *waterbath* sampai mencapai konsistensi yang lebih kental. Ketiga fraksi yang telah dihasilkan akan ditimbang untuk menghitung persentase rendemen terhadap berat awalnya. (Sari & Turahman, 2018).

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak buah belimbing wuluh

7.1 Flavonoid. Proses uji ciri kimia untuk mendeteksi kandungan flavonoid dalam sampel dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut. Ambil 1 gram serbuk atau ekstrak buah belimbing wuluh dan larutkan dalam 100 ml air. Panaskan campuran ini selama

sekitar 15 menit, kemudian saring menggunakan kertas saring. Setelah disaring, ambil 1 ml dari filtrat ini dan tambahkan serbuk magnesium dalam jumlah yang cukup, lalu teteskan 10 tetes larutan HCl pekat dan 10 tetes amil alkohol. Jika sampel mengandung flavonoid, maka akan terlihat perubahan warna menjadi kuning atau merah pada lapisan amil alkohol, yang menunjukkan keberadaan flavonoid dalam larutan. (Noer *et al.*, 2018).

7.2 Saponin. Timbang dan masukkan tiap-tiap 1 gam serbuk dan ekstrak buah belimbing wuluh ke dalam tabung reaksi, larutkan dengan 1 ml air dan panaskan selama 15 menit kemudian saring, tambahkan 2 ml etanol 70% kemudian di aduk, masukkan aquadest dan kocok filtrat dengan kuat kurang lebih 10 detik (Mojabet, 2003).

7.3 Tanin. Timbang dan masukkan tiap-tiap 1 gram serbuk dan ekstrak buah belimbing wuluh ke dalam tabung reaksi, kemudian larutkan dalam air 1 ml yang telah dipanaskan selama 15 menit lalu saring. Tambahkan 3 tetes FeCl_3 disetiap tabung pada filtrat. Sampel mengandung senyawa tanin jika warna yang dihasilkan adalah hijau kehitaman (Setyowati *et al.*, 2014).

7.4 Steroid. Langkah untuk menguji keberadaan steroid dan senyawa triterpenoid dalam sampel adalah sebagai berikut. Timbang 0,5 gram dari serbuk atau ekstrak buah belimbing wuluh, kemudian tambahkan 2 ml kloroform, 10 tetes asam anhidrat, dan 3 tetes H_2SO_4 pekat ke dalam tabung reaksi. Jika sampel mengandung steroid, akan terbentuk cincin berwarna merah. Selain itu, jika terbentuk warna merah atau ungu, ini menandakan adanya senyawa triterpenoid dalam sampel. (Ghosal dan Mandar, 2012).

7.5 Alkaloid. Untuk mendeteksi keberadaan beberapa senyawa tertentu dalam sampel, langkah-langkah uji dilakukan sebagai berikut. Pertama, diambil 0,5 gram serbuk atau ekstrak buah belimbing wuluh, lalu ditambahkan 1 ml HCL_2N dan 9 ml aquadest. Campuran ini dipanaskan selama 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian dibagi menjadi tiga bagian yang akan diuji masing-masing. Bagian pertama ditambahkan pereaksi *Mayer*, dan jika dalam sampel terkandung senyawa tertentu, akan terbentuk endapan berwarna putih agak kuning. Bagian kedua diberi pereaksi *Dragendorff*, dan keberadaan senyawa tertentu akan ditunjukkan oleh munculnya warna merah hingga jingga. Bagian ketiga diberi pereaksi *Bouchardat*, dan jika sampel mengandung senyawa tertentu, akan

terbentuk endapan berwarna merah hingga coklat. (Setyowati *et al.*, 2014).

8. Identifikasi *Staphylococcus aureus*

8.1 Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan cawan gores.

Untuk mengidentifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, inokulasi dilakukan dalam cawan petri yang berisi media *Mannitol Salt Agar* (MSA). Selanjutnya, cawan petri dibiarkan diinkubasi selama sekitar 24 jam pada suhu 37°C. Hasilnya, koloni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada media MSA akan menunjukkan ciri khas, yaitu perubahan warna media dari merah menjadi kuning.

8.2 Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram. Proses pewarnaan Gram dimulai dengan pembuatan preparat ulas yang telah difiksasi. Selanjutnya, kristal violet (Gram A) dioleskan merata pada preparat dan dibiarkan selama 1 menit. Setelah itu, preparat dibilas menggunakan aquadest. Langkah berikutnya adalah meneteskan larutan lugol (Gram B) pada preparat dan memberi waktu selama 1 menit sebelum kembali melakukan pencucian dengan aquadest. Preparat akhirnya dikeringkan setelah langkah-langkah pewarnaan tersebut. Tetesi alkohol pada preparat untuk melunturkan warna pada preparat, diamkan selama 30 detik, tetesi dengan safranin (Gram D), diamkan sebentar. Bilas preparat menggunakan aquadest, keringkan dengan melekatkan kertas tisu pada tepi ulasan, diamkan sampai ulasan mengering dan amati menggunakan mikroskop (Volk & Wheller, 2008). Hasil Gram positif jika pada bakteri jika sel berbentuk *coccus*, susunan bergerombol berwarna ungu seperti buah anggur. (Dewi, 2013).

8.3 Uji katalase. Pada *object glass* tambahkan beberapa tetes larutan H₂O₂ 3%, kemudian letakkan 1 ose koloni bakteri pada *object glass* yang sama dan amati hasil yang terbentuk. Hasil positif jika terbentuk gelembung udara (Dewi, 2013).

8.4 Uji koagulase. Langkah pertama dalam prosedur ini adalah mengambil 200 µl plasma dan memasukkannya ke dalam tabung reaksi steril secara aseptis. Selanjutnya, 3-4 ose biakan bakteri dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan campuran tersebut dicampur dengan hati-hati. Hasil dianggap positif jika pada dasar tabung reaksi terbentuk gumpalan atau endapan. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 termasuk dalam golongan bakteri koagulase positif.

9. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri dibiakkan dalam media miring *Nutrient Agar* (NA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, hasil isolat bakteri diencerkan dengan media cair *Brain Heart Infusion* (BHI) hingga homogen dengan bantuan vortex selama 15 menit sebelum digunakan untuk pengujian. Langkah ini bertujuan untuk mempersiapkan kultur bakteri yang homogen sebelum melanjutkan ke tahap pengujian (Aututik, 2018).

10. Pengujian aktivitas antibakteri buah belimbing wuluh

10.1 . Uji aktivitas antibakteri secara difusi. Penelitian ini menggunakan metode *disc diffusion* (difusi cakram kertas) untuk menguji aktivitas antibakteri zat yang ada. Pada metode ini, kertas cakram digunakan sebagai media untuk menampung zat antibakteri. Zat antibakteri diuji pada berbagai konsentrasi (20%, 10%, dan 5%), serta kontrol positif menggunakan amoksisilin dan kontrol negatif menggunakan DMSO 5%. Cakram kertas ditempatkan di atas lempeng agar yang telah diberi media MHA dan bakteri uji yang sudah ditanam. Proses ini diulang tiga kali. Kemudian, lempeng-lempeng ini diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasilnya diamati, dan zona hambat yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat diukur dari tepi cakram kertas hingga tepi zona yang tidak ditumbuhi oleh bakteri uji.

10.2 . Uji aktivitas antibakteri secara dilusi. Metode dilusi digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak atau fraksi yang diuji. Sepuluh tabung steril disiapkan, dua di antaranya digunakan untuk kontrol positif dan kontrol negatif, sedangkan delapan tabung lainnya digunakan untuk seri pengenceran. Setiap tabung dalam seri pengenceran mengandung larutan dengan konsentrasi yang berbeda, mulai dari 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, hingga 0,39%. Prosedurnya adalah sebagai berikut: Fraksi teraktif dimasukkan sebanyak 2 ml ke dalam tabung pertama, yang juga digunakan sebagai kontrol negatif. Tabung kesepuluh hanya berisi 1 ml larutan suspensi bakteri sebagai kontrol positif. Tabung kedua berisi 1 ml medium BHI dan 1 ml fraksi teraktif. Selanjutnya, 1 ml campuran dari tabung kedua dimasukkan ke dalam tabung ketiga, dan dari tabung ketiga, 1 ml campuran lagi dimasukkan ke dalam tabung keempat, dan seterusnya hingga tabung kesembilan. Dalam tabung kesembilan, ambil 1 ml

campuran tersebut dan buang. Kemudian, suspensi bakteri uji dalam medium BHI dimasukkan ke dalam tabung kedua hingga tabung kesembilan, masing-masing sebanyak 1 ml dan pada tabung 10 ditambahkan 2 ml suspensi bakteri. Tabung pertama dan tabung kesepuluh sudah berisi kontrol positif. Selanjutnya, semua tabung diinkubasi selama sekitar 24 jam pada suhu 37°C, dan diperhatikan kekeruhan yang terjadi. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan berdasarkan konsentrasi terendah dari larutan uji yang menghasilkan larutan yang jernih. Sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan berdasarkan konsentrasi terendah dari ekstrak atau fraksi teraktif yang tidak menumbuhkan koloni pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA) untuk bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Tabung yang menghasilkan hasil yang jernih diinkubasi dengan cara digoreskan pada media selektif, dan kemudian dibiarkan selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasilnya diamati dengan memeriksa keberadaan koloni pada media selektif.

11. Identifikasi golongan senyawa pada fraksi teraktif secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Melarutkan pelarut yang tepat dengan fraksi paling aktif dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh, totolkan fraksi pada plat KLT sebanyak 3 kali dengan jarak 1 cm dari sisi bawah menggunakan pipa kapiler. Masukkan fase gerak ke dalam *chamber* sebanyak 10 ml, alasi *chamber* dengan kertas saring dan jenuhkan. Proses penjenuhan berakhir ketika seluruh kertas saring terasa basah. Selanjutnya, elusi dilakukan dengan menempatkan plat KLT ke dalam *chamber* setelah bercak benar-benar mengering. Plat KLT kemudian diangin-anginkan hingga kering, dan noda-noda yang ada di atas plat KLT diidentifikasi menggunakan sinar ultraviolet (UV) dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Selain itu, pereaksi khusus juga digunakan untuk membantu dalam mendeteksi komponen yang ada pada plat KLT. Bercak yang terdeteksi akan digunakan untuk menghitung nilai R_f (faktor retensi) dan untuk menentukan penampilan warna yang ada pada plat KLT.

11.1 Identifikasi senyawa flavonoid. Silika gel GF254 digunakan sebagai fase diam, sementara campuran kloroform dan etil asetat dalam perbandingan 6:4 berfungsi sebagai fase gerak. Amoniak digunakan untuk mendeteksi noda uap saat mengidentifikasi flavonoid. Sebagai baku pembanding, kuersetin digunakan, dan pereaksi semprot

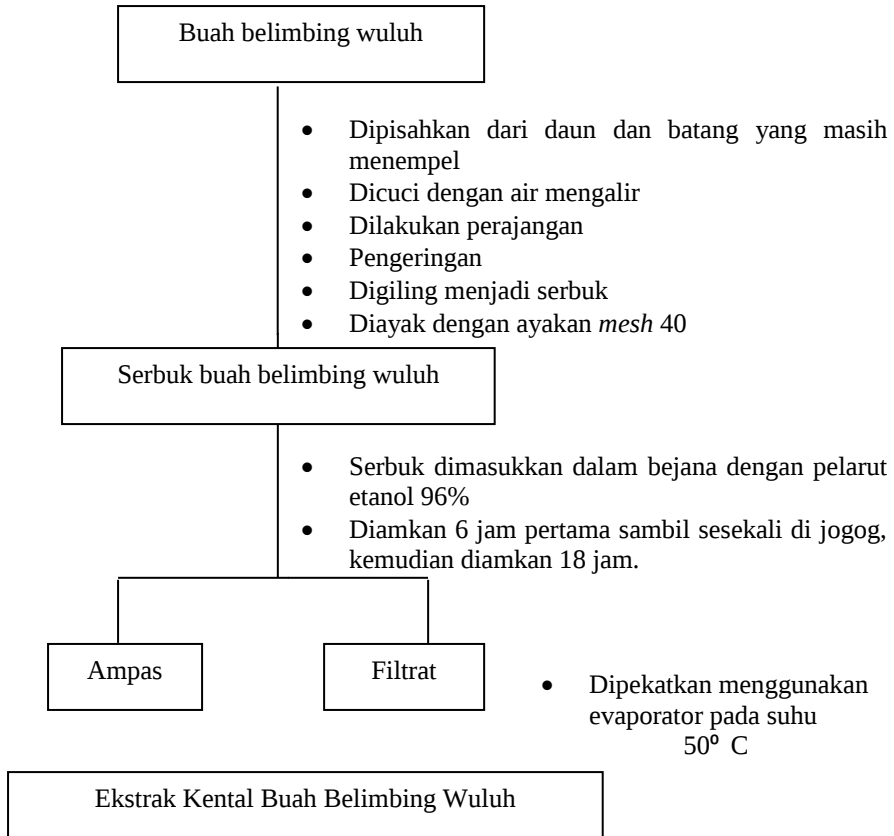
yang disebut sitroborat digunakan untuk memperjelas noda. Pada tahap deteksi, sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm digunakan untuk menghasilkan peredaman (absorpsi) dari noda yang terbentuk pada plat KLT. Sementara sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 366 nm menghasilkan fluoresensi, yang biasanya tampak sebagai noda berwarna hijau, hijau muda, atau merah muda. Setelah proses deteksi, pemberian amoniak akan mengubah warna noda menjadi hijau, dan hasil KLT dapat dibandingkan dengan baku pembanding kuersetin untuk identifikasi lebih lanjut (Koirewoa *et al.*, 2012).

11.2 Identifikasi senyawa tanin. Tanin dapat dikenali melalui metode Kromatografi Lapis Tipis dengan menggunakan campuran *n*-heksana dan etil asetat dalam perbandingan 6:4 sebagai pelarut sebanyak 8 ml, sedangkan Silika gel GF254 digunakan sebagai permukaan pemisah. Proses identifikasi ini juga memerlukan baku pembanding seperti asam galat dan menggunakan FeCl_3 sebagai zat semprot. Hasil positif dapat diidentifikasi dengan munculnya noda berwarna hitam setelah terpapar pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. (Kusumo *et al.*, 2017).

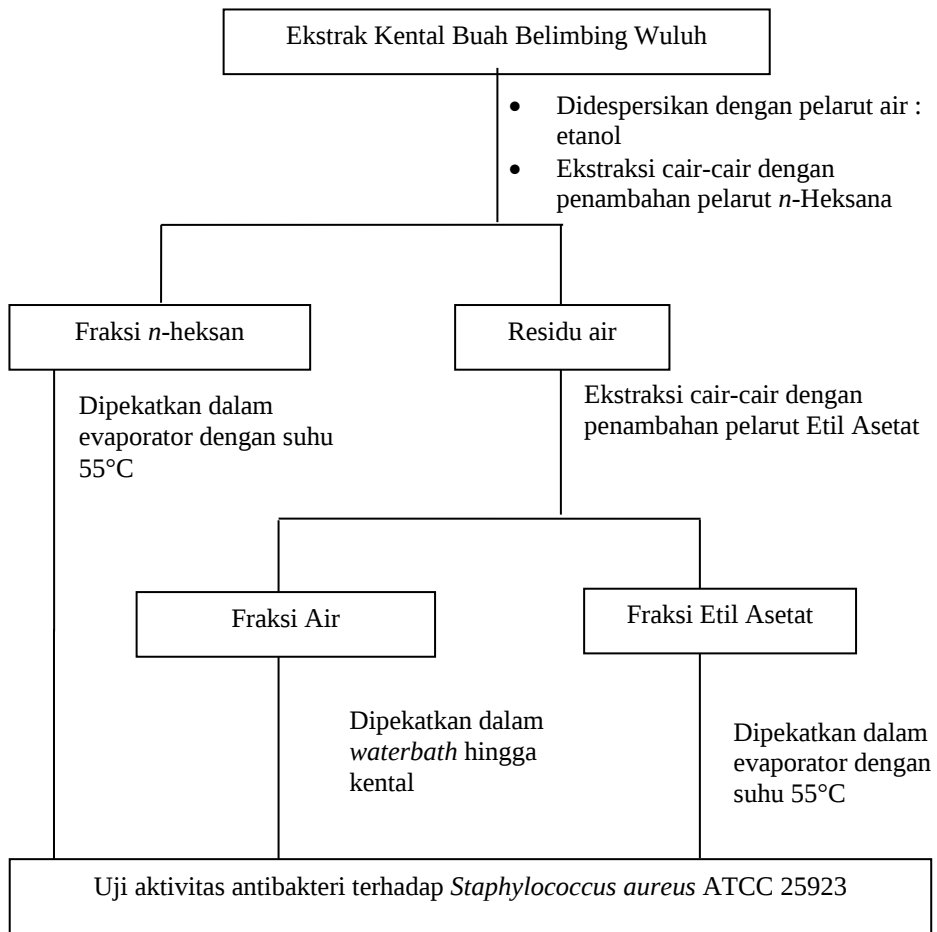
E. Analisis Data

Hasil uji aktivitas antibakteri dinyatakan dalam bentuk diameter zona hambat atau zona bening yang diukur dalam milimeter. Nilai-nilai ini didapat dari perbandingan dengan kontrol positif yang dikenakan pada bakteri yang sama. Data hasil tersebut kemudian dianalisis menggunakan metode *one way* ANOVA. Untuk memenuhi persyaratan uji ANOVA, penting bahwa sampel-sampel berasal dari kelompok yang independen, varian antar kelompok memiliki tingkat homogenitas yang setara, dan data dari masing-masing kelompok harus terdistribusi secara normal. Untuk memverifikasi distribusi normal, dapat dilakukan uji statistik seperti tes *Shapiro-Wilk* (Widiyanto, 2013).

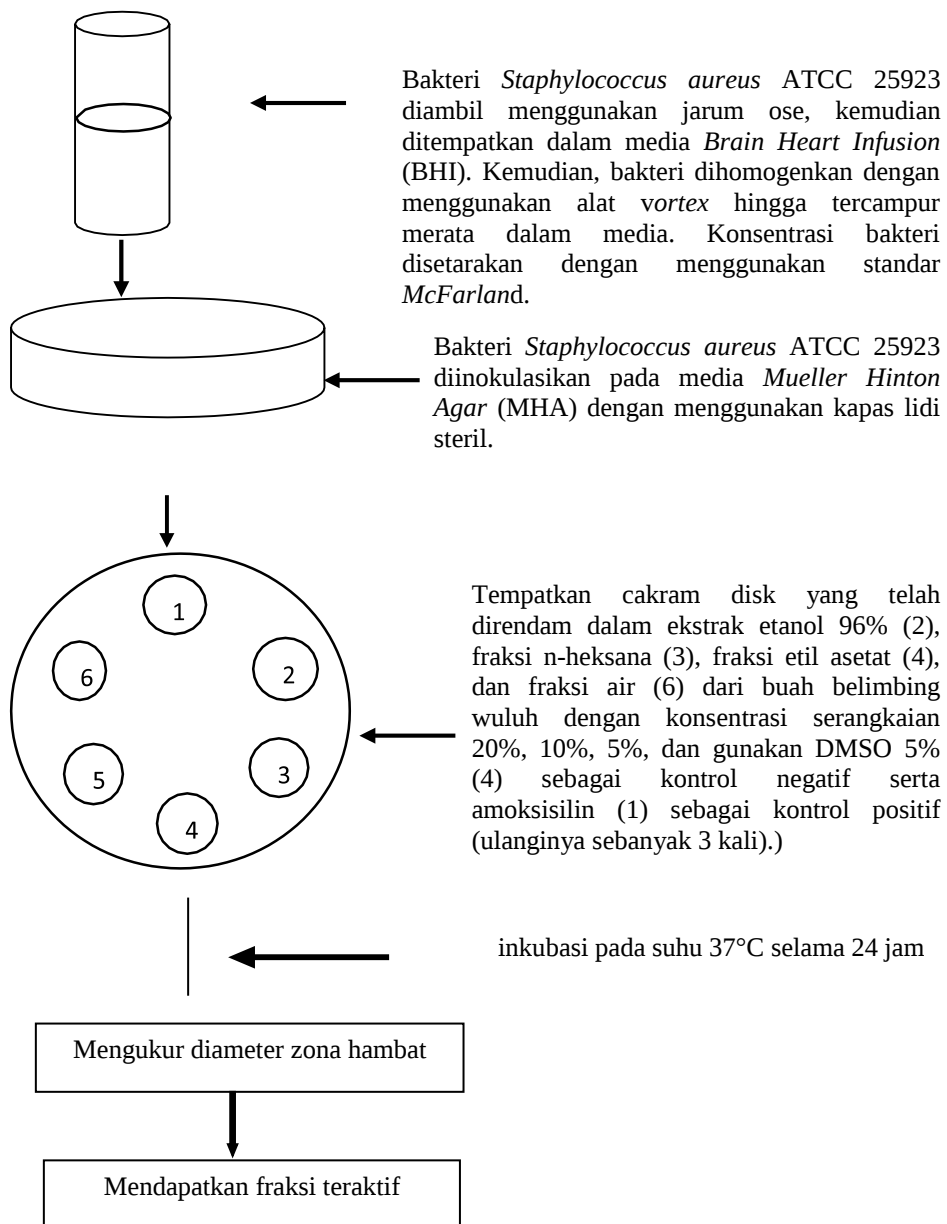
F. Skema



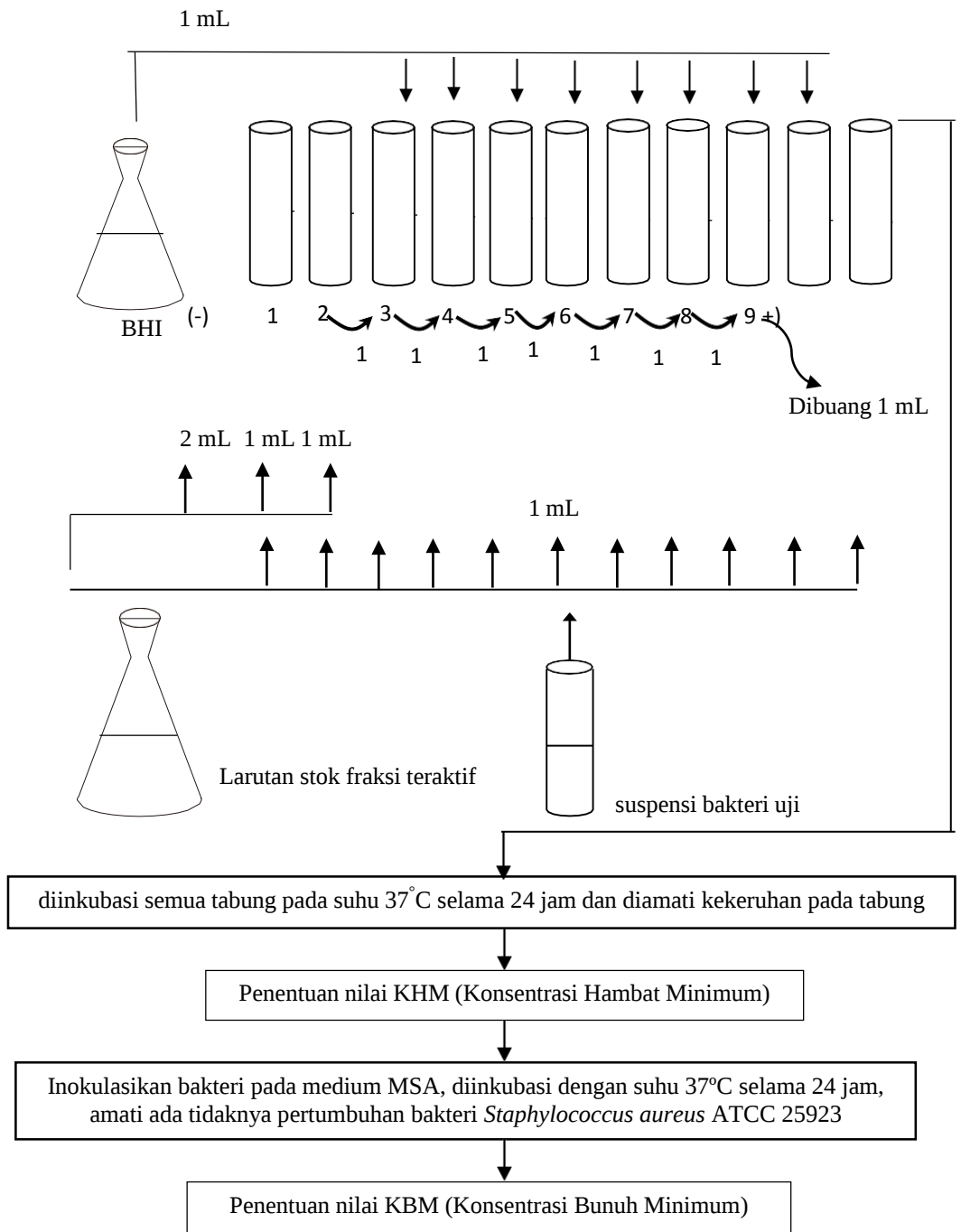
Gambar 2. Bagan pembuatan ekstrak buah belimbing wuluh



Gambar 3. Skema pembuatan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)



Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air buah belimbing wuluh terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan metode difusi



Gambar 5. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan metode dilusi