# BAB III

**METODE PENELITIAN**

## Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deksriptif. Dengan tahapan pelaksanaan penelitian meliputi pengumpulan sampel, pengolahan sampel, pembuatan larutan bahan, pembuatan ekstraksi dengan maserasi, skrinning fitokimia, identifikasi dan fraksinasi alkaloid menggunakan alat Spektrofotometri UV-Vis dan Spektroskopi FT-IR, dan uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli.*

### Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdapat variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dari penelitian ini adalah Kulit Kayu Raru, Simplisia kulit Kayu Raru, Serbuk simplisia kulit Kayu Raru, Ekstrak etanol dan ekstrak metanol dari kulit Kayu Raru, Fraksinasi cair-cair pelarut kloroform. Variabel terikat dari penelitian ini adalah Morfologi tumbuhan, Karakteristik simplisia, Senyawa metabolit sekunder, Fraksi alkaloid, Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli.*

### Parameter Penelitian

Parameter pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Parameter dari karakteristik serbuk simplisia Kulit Kayu Raru yaitu, makroskopik, mikroskopik, kadar air, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut dalam etanol, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam.
2. Parameter dari skrining fitokimia dari ekstrak etanol dan ekstrak metanol Kulit Kayu Raru yaitu adanya senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid / triterpenoid, dan glikosida.
3. Parameter dari fraksi alkaloid dari fraksinasi cair-cair pelarut kloroform yaitu kadar alkaloid dan gugus fungsional alkaloid.
4. Parameter dari uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yaitu zona hambat bakteri.

## Jadwal dan Lokasi Penelitian

### Jadwal Penelitian

Dilakukan pada bulan Februari 2024 sampai bulan Juni 2024

### Lokasi Penelitian

Pembuat simplisia, karakterisasi simplisia dan pembuatan ekstrak di Laboratorium Botani Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al- Washliyah Medan. Skrining fitokimia, Identifikasi dan Isolasi Alkaloid di Laboratorium Farmasi Terpadu Muslim Nusantara Al- Washliyah Medan. Uji antibakteri di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muslim Nusantara Al- Washliyah Medan.

## Bahan dan Alat

### Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Kulit Kayu Raru *(Cotylelobium melanoxylon* Pierre), Aquadest, Metanol teknis, Etanol Teknis, HCL (Asam klorida), NaOH (Natrium Hidroksida), Bahan baku Kafein, CHCL3 (Kloroform), Na2O4P. 12H2O (Sodium Tiosulfat), C6H8O7.H2O (asam sitrat), BCG (Bromocresol Green), Dapar Phosfat (pH 4,7), NH4OH (Ammonium Hidroksida), NA (Nutrient Agar), DMSO, NaCL (Natrium Klorida), H2SO4 (Asam Sulfat), BaCL2 (Barium Klorida)

### Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Beaker glass, ayakan mesh 40, vortex, Hot Plate, Tabung reaksi, Rak tabung reaksi, pipet volume, Rotary evaporator, labu tentukur, waterbath, Gelas ukur, pH Meter, Tanur, Deksikator, Cawan Porselin, Neraca analitik, Spektrometer UV-Vis dan Spektroskopi FT-IR



## Persiapan Bahan

### Determinasi Sampel

Determinasi tanaman Kulit Kayu Raru dilakukan dilaboratorium pengujian bahan herbal Universitas Sumatera Utara Medan (USU)

### Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari Tapanuli Tengah, dengan cara mengikis kulit Kayu Raru dari pohonnya menggunakan pisau secara manual.

### Pengumpulan Sampel

Pengumpulan sampel dilakukan dengan cara *Purposive,* yaitu sampel diambil dari satu daerah saja tanpa perbandingan dengan daerah lain. Sampel Kayu Raru diambil dari daerah Sibolga, Tapanuli tengah.

### Pengolahan Sampel

Sampel Kulit Kayu Raru *(Cotylelobium melanoxylon* Pierre)dikumpulkan kemudia disortasi basah dengan tujuan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan lainnya. Lalu dilakukan pencucian dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada sampel. Kemudian dilakukan perajangan dengan cara dipotong kecil-kecil yang bertujuan untuk mempermudah saat proses pengeringan, pengepakan, dan penggilingan. Selanjutnya, dilakukan pengeringan dengan cara pengeringan buatan yaitu dimasukkan kedalam lemari pengering dengan suhu 40-50℃.

Kemudian, dilakukan sortasi kering dengan tujuan untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor-pengotor lainnya yang masih ada tertinggal pada simplisia kering. Lalu, simplisia diserbukkan menggunakan blender, diayak, dan ditimbang. Disimpan serbuk simplisia yang telah diperoleh didalam wadah yang tertutup rapat (Depkes RI, 1985).



### Pembuatan Larutan Pereaksi

1. **Pereaksi Bouchardat**

Sebanyak 4 gram kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml aqua dest kemudian 2 gram iodium dilarutkan sedikit demi sedikit kedalamnya, setelah semuanya larut ditambahkan air suling hingga volume 100 ml (Ditjen POM,1979).

1. **Pereaksi Mayer**

Sebanyak 1,36 gram raksa (II) klorida dilarutkan sedikit demi sedikit dalam 60 ml aqua dest. kemudian pada wadah lain sebanyak 5 gram kaliu iodide dilarutkan dalam 10 ml air suling, kedua larutan dicampurkan dan volume dicukupkan dengan air suling sehingga 100 ml (Ditjen POM,1979).

### Pereaksi Dragendrof

Sebanyak 8 gram bismuth (II) nitrat dilarutkan 20 ml asam nitrat pekat. Pada wadah lainm ditimbang 27,2 gram kalium iodida dilarutkan dilarutkan dalam 50 ml air suling. Kedua larutan dicampurkan sama banyak dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan air suling hingga 100 ml (Ditjen POM,1979).

### Pereaksi Molish

Sebanyak 3 gram alfa naftol ditimbang kemudian ditambahkan beberapa tetes etanol kemudian dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N hingga volume 100 ml (Ditjen POM,1979).

### Asam Klorida 2N

Sebanyak 16,67 ml asam klorida pekat diencerkan dengan air suling hingga volume 100 ml (Depkes RI, 1995).

### Asam Sulfat 2N

Sebanyak 5,4 ml asam sulfat pekat diencerkan dengan air suling hingga volume 100 ml (Depkes RI,1995).

### Besi (III) Klorida 1%

Sebanyak 1 g besi (III) klorida dilarutkan sedikit demi sedikit kedalam asam klorida 0,5 dan volumenya dicukupkan hingga volume 100 ml (DepkesRI,1995).

### Timbal (II) asetat 0,4 M

Sebanyak 15,17 g timbal (II) asetat dilarukan sedikit demi sedikit dalam air suling bebas karbondioksida hingga volume 100 ml (Depkes RI,1995).

### Natrium hidroksida 2N

Sebanyak 8,002 g natrium hidroksida dilarukan sedikit demi sedikit dalam airsuling hingga volume 100 ml (Depkes RI,1995).

### Pereaksi Liebermann-Burchard

Sebanyak 5 ml asam asetat anhidrida dicampurkan dengan 5 ml asam sulfat pekat kemudian ditambahkan etanol hingga volume 50 ml (Depkes RI,1995)

## Pemeriksaan Karakteristik Simplisia

### Karakteristik Simplisia

Pemeriksaan karakteristik simplisia meliputi pemeriksaan makroskopik, mikroskopik, penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abutotal, dan penetapan kadar abu tidak larut asam.

### Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan mengamati bentuk luar dari Kulit Kayu Raru yaitu, warna, bentuk, rasa, dan ukuran daun (Depkes RI, 1979).

### Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia Kulit kayu raru. Kulit kayu raru yang segar diiris secara melintang dan membujur, diletakkan diatas kaca objek yang telah ditetesi dengan larutan kloralhidrat kemudian dipanaskan sebentar diatas api bunsen dan ditutupi dengan cover glas dan diamati dibawah mikroskop (Depkes RI, 1979).

### Penetapan Kadar Air

Toluen dimasukkan kedalam labu alas bulat sebanyak 200 mL dan akuades 2 mL. Destilasi selama 2 jam, sampai seluruh air terdestilasi diperoleh toluen jenuh setelah itu toluen didinginkan dan disisihkan sedikit untuk pembilasan, volume air pada tabung penerima dibaca sebagai volume air awal dengan ketelitian 0,05 mL. Kemudian dimasukkan 5 gram serbuk simplisia kulit kayu raru yang telah ditimbang seksama kedalam masing-masing labu yang berisi toluen jenuh, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur kurang lebih 2 tetes tiap detik sampai sebagian besar air tersuling. Kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen jenuh. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit. Kemudian tabung penerima dibiarkan dingin sampai suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna volume air dibaca sebagai volume air akhir dengan ketelitian 0,05 ml sebagai volume air akhir. Selisih kedua volume ini dibaca dan diperhitungkan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa dalam persen (Depkes RI, 1989).

%Kadar air simplisia

### Penetapan Kadar Sari Larut dalam Air

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia kulit kayu raru dimaserasi selama 24 jam dalam 100 mL campuran air dan kloroform (2,5 kloroform dalam air sampai 1000 ml) dalam labu bersumbat sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring, sejumlah 20 mL filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan dangkal berdasar rata dan telah ditara, sisanya dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar sari larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

Kadar sari larut air =

### Penetapan Kadar Sari Larut dalam Etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia kulit kayu raru dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml etanol 96% dalam labu bersumbat sambil dikocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring, 20 ml filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan berdasar rata yang telah ditara dan sisanya dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

### Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia kulit kayu raru ditimbang seksama dimasukkan dalam kurs porselin yang telah dipijar dan ditara, kemudian diratakan. Kurs dipijar perlahan-lahan, kemudian naikkan suhu secara bertahap hingga 600°C sampai arang habis, jika arang masih tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa dan kertas saring dalam kurs yang sama. Masukkan filtrat ke dalam kurs, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

### Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dalam penetapan kadar abu total dididihkan dalam 25 mL asam klorida 2N selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu dan dicuci dengan air panas, dipijarkan kemudian didinginkan dan ditimbang sampai bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

### Susut Pengeringan

Sebanyak 2 g ekstrak dimasukkan ke dalam kurs porselin tertutup yang sebelumnya telah dipanaskan selama 30 menit pada suhu 105˚C dan telah ditarer. Ekstrak diratakan dalam kurs dengan menggoyangkan kurs hingga terbentuk lapisan tebal 5-10 mm, lalu ditimbang. Dimasukkan ke dalam oven lalu tutupnya dibuka, dikeringkan pada suhu 105˚C hingga diperoleh bobot tetap. Didinginkan dalam desikator dan dihitung nilai persentasinya (Utami, 2020).



## Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dari Kulit Kayu Raru (*Cotylelobium melanoxylon* Pierre) meliputi golongan senyawa Alkaloid, Flavonoid, Saponin, Tanin, Glikosida, Steroida/Triterpenoid.

### Pemeriksaan Alkaloid

Sampel serbuk, ekstrak metanol dan ekstrak etanol Kulit Kayu Raru (*Cotylelobium melanoxylon* Pierre) ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring, filtrat dipakai untuk tes alkaloid sebagai berikut:

1. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapat menggumpal berwarna putih atau kuning.
2. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaski Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.
3. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaski Dragendroff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga Alkalaoid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sedikitnya 2 reaksi dari 3 percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

### 3.6.2 Pemeriksaan Flavonoida

Sebanyak 0,5 g sampel serbuk, ekstrak metanol dan ekstrak etanol Kulit Kayu Raru (*Cotylelobium melanoxylon* Pierre) ditambahkan 10 ml metanol P, dengan menggunakan alat pendingin balik selama 10 menit. Saring panas melalui kertas saring kecil berlipat. Encerkan filtrate dengan 10 ml air. Setelah dingain tambahkan 5ml eter minyak tanah P, kocok hati-hati, diamkan. Ambil lapisan metanol, uapkan pada suhu 40 °C dibawah tekanan. Sisa dilarutkan dalam 5ml etil 24 asetat P, saring. Filtrate yang diperoleh kemudian diambil 1 ml larutan percobaan, sisa larutkan dalam 1 ml etanol (95%) P, lalu ditambahkan 0,1 g serbuk mg dan 1 ml asam klorida pekat P. Flavonoid positif jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu. Jika terjadi warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron. (Depkes RI, 1995).

### 3.6.3 Pemeriksaan Saponin (uji busa)

Sampel serbuk, ekstrak metanol dan ekstrak etanol Kulit Kayu Raru (*Cotylelobium melanoxylon* Pierre) yang sudah di gerus di ambil sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan kocok selama 10 detik. Jika terbentuk buih setinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit, dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

### 3.6.4 Pemeriksaan Tanin

Sampel serbuk, ekstrak metanol dan ekstrak etanol Kulit Kayu Raru (*Cotylelobium melanoxylon* Pierre) yang sudah di gerus halus kemudian ditambahkan 10 ml metanol, disaring dan dibagi menjadi 2 bagian di dalam tabung reaksi, salah satu tabung reaksi ditambahkan FeCl3 sebanyak 2 tetes, diamati perubahan warna pada sampel, jika warna sampel berubah menjadi warna biru kehitaman, ini mengindikasikan bahwa di dalam sampel tersebut mengandung senyawa tannin (Kasih dkk, 2022)

### 3.6.5 Pemeriksaan Glikosida

Sampel serbuk, ekstrak metanol dan ekstrak etanol Kulit Kayu Raru (*Cotylelobium melanoxylon* Pierre) masing-masing ditimbang sebanyak 3 gram, kemudain disari dengan 30 ml campuran 7 ml bagian etanol 95 % P dan 3 bagian volume air dalam alat pendingin alir balik selama 10 menit, dinginkan, saring. Diambil 20 ml filtrate ditambahkan 25 ml aquades dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrate disari dengan 20 ml campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol P. Kumpulan sari air diuapkan pada temperature tidak lebih dari 50°C. Sisanya dilarutkan dalam 2 ml methanol P. Kemudian diambil 0,1 ml larutan percobaan dimasukkan kedalam tabung reaksi, diuapkan di penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes molis LP. Tambahkan hati-hati 2ml asam sulfat P melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas cairan menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI, 1995).

### 3.6.6 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Ditimbang 1 gram sampel serbuk, ekstrak metanol dan ekstrak etanol Kulit Kayu Raru (*Cotylelobium melanoxylon* Pierre), ditambahkan 10 ml klroform, dikocok dan disaring filtratnya, ditambahkan 10 tetes asam asetat glacial pada filtrat uji, ditambahkan 10 tetes H2SO4, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi, Jika terbentuk warna hijau/biru kehijauan menunjukkan adanya senyawa golongan steroid (Puspitasari dkk, 2013).

## Pembuatan Ekstrak Etanol dan Ekstrak Metanol Kulit Kayu Raru

### Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Kayu Raru

Ekstrak etanolkulit kayu raru (*Cotylelobium melanoxylon* Pierre) dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam bejana, dituangi dengan pelarut etanol 96 % sebanyak 3750 ml, didiamkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk, lalu di peras sehingga diperoleh maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dibilas dengan etanol 96 % sebanyak 1250 ml, pindahkan kedalam satu bejana tertutup (maserat I dan maserat II) biarkan ditempat yang sejuk terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari, kemudian enap tuangkan lalu disaring sehingga diperoleh hasil maserat, lalu dipekatkan dengan cara diuapkan pada rotary evaporator dengan suhu tidak lebih dari 50 ºC hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

### Pembuatan Ekstrak Metanol Kulit Kayu Raru

Ekstrak metanolkulit kayu raru (*Cotylelobium melanoxylon* Pierre) dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam bejana, dituangi dengan pelarut metanol 96 % sebanyak 3750 ml, didiamkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk, lalu di peras sehingga diperoleh maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dibilas dengan metanol 96 % sebanyak 1250 ml, pindahkan kedalam satu bejana tertutup (maserat I dan maserat II) biarkan ditempat yang sejuk terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari, kemudian enap tuangkan lalu disaring sehingga diperoleh hasil maserat, lalu dipekatkan dengan cara diuapkan pada rotary evaporator dengan suhu tidak lebih dari 50 ºC hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

## Analisis Kuantitatif Alkaloid

### Pembuatan Larutan Induk Kaffein

50 mg kafein dilarutkan dengan akuades panas dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL. Kemudian dipipet sebanyak 2,5 mL dan ditambahkan akuades ke dalam labu ukur 25 mL sehingga diperoleh konsentrasi 100 µg/mL (Andriani, dkk., 2023).

### Pembuatan Larutan *Bromocresol Green* (BCG)

Ditimbang sebanyak 69,8 mg bromocresol green kemudian dicampurkan dengan 3 mL NaOH 2N dan 5 mL aquades. Lalu panaskan pada suhu 50-60°C selama 15 menit sampai larut sempurna. Kemudian dicampurkan dengan 1 liter aquades (Andriani dkk, 2023).

### Pembuatan Buffer Phosfat pH 4,7

Dapar Phosfat pH 4,7 dibuat dengan cara disodium fosfat (Na2HPO4) 0,2M dicampurkan dengan asam sitrat (C6H8O7) 0,2M hingga menghasilkan pH 4,7 (Andriani dkk, 2023).

### Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Kafein

Pembuatan panjang gelombang maksimum larutan kafein 100 ppm, di pipet 0,7 mL dari larutan kafein 100 µg/mL dimasukkan dalam labu ukur 10 mL menjadi konsentrasi 7 µg/mL. Kemudian diukur menggunakan spektrofotomteri UV-Vis pada range panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum tersebut digunakan untuk mengukur serapan dari sampel ekstrak Kulit kayu raru (Karim dkk, 2022).

### Pengukuran Kurva Standar Kafein

Dipipet 0,5 ; 0,7 ; 0,9 ; 1,1 ; 1,3 mL dari larutan standar kafein 100 ppm dan diencerkan sampai 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar berturut-turut adalah 5; 7; 9; 11; 13 µg/mL. Kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 272 nm dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Andriani dkk, 2023).

### Pembuatan Larutan Ekstrak Kulit Kayu Raru

Ditimbang 0,1 g ekstrak metanol dan etanol Kulit Kayu raru dan dilarutkan sampai 10 mL menggunakan etanol, kemudian dikocok hingga homogen sehingga diperoleh konsentarasi 1000 µg/mL. Lalu di pipet sebanyak 1 mL dan dilarutkan dengan etanol sampai dengan 10 mL. Lalu dikocok sampai homogen sehingga di peroleh konsentrasi 100 µg/mL (Andriani dkk, 2023).

### Penentuan Kadar Alkaloid Ekstrak Kulit Kayu Raru

Dipipet 2 mL ekstrak Kulit Kayu Raru masing-masing ekstrak etanol dan metanol. Lalu ditambahkan 2 mL dapar posfat pH 4,7 dan 2 mL larutan BCG. Kemudian diekstraksi dengan 3 mL kloroform sebanyak tiga kali menggunakan vortex. Diambil fase kloroform dan dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan kloroform sampai batas volume. Lalu diukur absorbansi pada panjang gelombang 272 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Andriani dkk, 2023).

## Analisis Kualitatif Alkaloid

### Fraksinasi Alkaloid dari Ekstrak Etanol dan Ekstrak Metanol Menggunakan Ekstraksi Cair-Cair Pelarut Kloroform

Ekstrak metanol dan ekstrak etanol yang diperoleh ditimbang sebanyak 25 g dilarutkan dengan aquadest sebanyak 100 mL. Kemudian ditambahkan dengan HCL 2M lalu di ukur pH (1-3). Kemudian diekstraksi dengan pelarut kloroform sebnayak 50 mL dengan menggunakan alat corong pisah. Setelah diekstraksi terjadi dua lapisan yaitu lapisan air dan lapisan kloroform, selanjutnya lapisan air ditambahkan NH4OH di ukur pH (8-10). Kemudian diekstraksi kembali dengan pelarut kloroform sebanyak 50 mL dengan menggunakan alat corong pisah. Ekstrak kloroform yang diperoleh diuapkan di penangas air kemudian ditambahkan KBr, Lalu di ukur absorbansi nya menggunakan Spektroskopi FT-IR (Rustiah, 2018).

## Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Ekstrak Metanol Kulit Kayu Raru Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

### Sterilisasi Alat Pengujian Aktivitas Antibakteri

Sebelum melakukan pembuatan media dan pengujian antibakteri alat-alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahuku. Alat-alat non gelas disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121ºC, sedangkan alat-alat gelas disterilkan dengan oven suhu 160-170ºC selama 1 jam. Media, kawat ose dan pingset menggunakan api bunsen (Faizah, 2021).



### Pembuatan Media Peremajaan Bakteri

Media yang digunakan yaitu media *Nutrient Agar* (NA). Medium *Nutrient  
Agar* (NA) dengan spatula atau sendok yang telah di sediakan ditimbang  
sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan  
250 ml aquadest, kemudian dipanaskan di atas *hot plate* sampai bahan larut  
sempurna. Pengadukan dilakukan dengan memasukkan magnetik stirer ke  
dalam larutan. Larutan dipanaskan hingga berwarna kuning jernih kemudian  
dituang ke dalam erlenmeyer yang telah disterilkan. Selanjutnya, media  
tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121ºC selama 15 menit.  
Media yang telah steril dituang kedalam cawan petri, setelah memadat  
media diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam (Faizah, 2021).

### Pembuatan Media dan Sterlisasi Media Uji

Media yang digunakan yaitu media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Medium *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan spatula atau sendok yang telah di sediakan ditimbang sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 250 ml aquadest, kemudian dipanaskan di atas *hot plate* sampai bahan larut sempurna. Pengadukan dilakukan dengan memasukkan magnetik stirer ke dalam larutan. Larutan dipanaskan hingga berwarna kuning jernih kemudian dituang ke dalam erlenmeyer yang telah disterilkan. Selanjutnya, media  
tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121ºC selama 15 menit.  
Media yang telah steril dituang kedalam cawan petri, setelah memadat  
media diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam (Faizah, 2021).

### Pembuatan Standar Mc. Farland 0,5

Sebanyak 9,95 mL H2SO4 1% dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 0,05 mL Bacl2 1%. Lalu larutan dikocok hingga homogeni. Apabila kekeruhan suspensi bakteri uji adalah sama dengan kekeruhan suspensi standar, berarti konsentrasi suspensi bakteri adalah 1,5 x 108 (Coloni Forming Unit) CFU/mL (Primadiamanti dkk., 2022).

### Pembuatan Larutan Nacl 0,9%

Timbang 0,9 gram natrium klorida lalu dilarutkan dalam air suling sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 ml sampai larut sempurna. Ditambahkan air suling steril sampai garis tanda, dimasukkan dalam erlenmeyer steril yang ditutup lalu disterilkan dalam autoklaf suhu 121℃ (Maulana dkk., 2020)



### Pembuatan Suspensi Bakteri

Tabung reaksi dimasukkan 10 mL larutan NaCl 0,9% steril. Bakteri diambil dengan jarum ose steril. Kemudian disuspensikan ke dalam 10 mL larutan NaCl 0,9% steril. Suspensi bakteri dibuat hingga didapat kekeruhan yang sesuai standar kekeruhan Mc. Farland (Primadiamanti dkk., 2022).



### Pembuatan Konsentrasi Sampel, Kontrol Positif, dan Kontrol Negatif

Timbang ekstrak etanol dengan melarutkan 3 gram ekstrak kental ke dalam 5 mL DMSO, untuk metanol dilarutkan 3 gram ekstrak kental kedalam 5 mL DMSO. Kontrol negatif pada penelitian ini menggunakan DMSO 10% dalam aquades dengan cara 10 mL DMSO dimasukkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan akuades sampai volumenya 100 mL. Kontrol positif yang digunakan sebagai pembanding yaitu antibiotik *levofloxacine* 5*µg/disc* dengan cara memasukkan 0,5 gram dilarutkan kedalam DMSO 5 mL lalu diambil 100 µL (Faizah, 2021).

### Preparasi dan Uji Aktifitas Antibakteri

Tahapan preparasi uji bakteri yang dilakukan meliputi peremajaan bakteri  
*Escherichia coli* dan *Stapylococcus aureus* yang dilakukan dengan masing-masing diambil satu ose kemudian diinokulasi dengan cara digoreskan pada medium nutrient agar (NA). Setelah itu diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam. Selanjutnya pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* dan *Stapylococcus aureus* dilakukan dengan cara mengambil 1 ose koloni dari media nutrient agar ke tabung reaksi yang berisi 10 mL NaCl fisiologis hingga diperoleh kekeruhan sama dengan kekeruhan standart *Mc Farland.*

Pengujian daya hambat ekstrak etanol Kulit kayu raru dilakukan dengan  
metode difusi agar menggunakan kertas cakram *(paper disc)* berdiameter 6  
mm dengan bakteri uji *Escherichia coli* dan *Stapylococcus aureus* karena  
metode ini merupakan metode sederhana yang mudah dan cepat untuk  
pengujian aktivitas antibakteri, uji aktivitas antibakeri dilakukan dengan  
empat kali pengulangan.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menuangkan *Mueller Hinton Agar* (MHA) kedalam cawan petri sampai memadat kemudian mengambil suspense bakteri masing-masing sebanyak 100 µL. Kemudian masukkan masing-masing ekstrak Kulit Kayu Raru yaitu ekstrak etanol dan ekstrak methanol dan control positif Levofloxacin dan control negative DMSO dan diberi tanda kemudian di inkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam sampai muncul daerah zona hambat dengan melihat zona bening disekitar media. Kemudian hitung zona hambat dengan menggunakan jangka sorong (Faizah, 2021).

## Pengolahan Data

Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan dengan menghitung diameter  
zona hambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang diukur dalam satuan mm. Zona hambat adalah zona bening pada daerah sekeliling *paper disc* yang tidak ditemukan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang diukur menggunakan jangka sorong.