

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT
DAN AIR EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG
(*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) TERHADAP
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**



Oleh:

**Dwi Yuli Wulandari
19134009A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT
DAN AIR EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG
(*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) TERHADAP
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi pada fakultas Farmasi
Univeritas Setia Budi*

Oleh :

**Dwi Yuli Wulandari
19134009A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI
Berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT
DAN AIR EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG
(*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) TERHADAP
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**

Oleh:
Dwi Yuli Wulandari
19134009A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 13 Juni 2017



Dekan ,

Prof. Dr. R. A. Oetari, S.U., M.M., M.Sc., Apt

Pembimbing,

Dr. Ana Indrayati, M.Si

Pembimbing Pendamping,

Reslaly Harjanti, S.Farm., M.Sc., Apt

Penguji :

1. Dra. Nony Puspawati, M.Si
2. Fransiska Leviana, S.Farm, M.Sc., Apt
3. Destik Wulandari, S.Pd., M.Si
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, Juni 2017



Dwi Yuli Wulandari

HALAMAN PERSEMBAHAN

“ Allah akan mengangkat orang-orang yang beriman di antara kalian dan orang-orang yang berilmu beberapa derajat”

(QS. Al-Mujadilah: 21)

“Keutamaan orang yang berilmu atas orang yang tidak berilmu adalah seperti keutamaan bulan purnama atas semua bintang-bintang.”

(SR Abu Dawud & At Tirmidzi)

Sudah ada yang mengatur jalan hidup, dimana kita sebagai pemeran utama yang tak tahu bagaimana skenario aslinya. Hanya jalani dengan ikhlas dan bersyukur, tidak lupa berusaha dan berdoa, Allah SWT memberikan apa yang kita butuhkan bukan apa yang kita inginkan.

Kupersembahkan karya ini untuk :

Allah SWT yang dengan rahmat dan kasih sayang-Nya

penulis dapat menyelesaikan skripsi ini

Papah dan Mamahku tercinta terimakasih atas doanya

Kakakku yang kusayangi

Agama, almamater, bangsa dan negaraku

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum wr. wb

Alhamdulillah saya panjatkan syukur kepada Allah S.W.T atas kesehatan dan penyertaan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI n-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853”**. Skripsi ini disusun sebagai sebuah pembelajaran dan menjadi salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) di Fakultas Farmasi, Universitas Seti Budi Surakarta.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penulisan skripsi ini, namun demikian penulis sudah berusaha agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis maupun pembaca nantinya. Banyak dukungan dari berbagai pihak kepada penulis sehingga mampu menyelesaikan penulisan skripsi ini, oleh karena itu penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA, selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
3. Dr. Rina Herowati, S.Si., M.Si., Apt, selaku pembimbing akademik yang senantiasa membimbing dan memberi nasihat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si, selaku pembimbing utama yang selalu mendukung, membimbing, menasehati dan memberikan semangat kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Reslely Harjanti, S.Farm., M.Sc., Apt, selaku pembimbing pendamping yang selalu mendukung, membimbing dan mengarahkan penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Bapak Ibu penguji skripsi, segenap dosen, dan staf laboratorium Universitas Setia Budi yang telah membantu dan membimbing penulis selama melaksanakan penelitian.

7. Kedua orang tua ku tercinta “Bapak Suwardi” dan “Ibu Nor Asiah” atas doa yang selalu menyertai dan kasih sayang serta motivasi yang selalu diberikan selama ini.
8. Kakak ku Setya Chandra Gunawan dan Aan Yunita Sari yang selama ini selalu memberi semangat.
9. Teman-teman seperjuangan teori 5 2013, FKK 4, “team upak-upuk” skripsi (Nad, Ica, Ipik), grup luar biasa (M. Abi Rohman, Hardono, Wisnu, Imam Choiri, Purwanita, Irsyad, Ica, Ipik), InsyaAllah calon jodoh (Patricius Prima Dimas Putranto), anak-anak penghuni “kost putri Syafa” yang selalu memberi semangat.
10. Teman-teman yang tidak bisa disebutkan satu persatu, selalu mendukung dan membantu hingga skripsi ini selesai.

Semoga Allah SWT memberikan limpahan berkat kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan dan masih terdapat banyak kekurangan serta kesalahan yang tidak disadari penulis. Penulis mengharapkan saran dan kritik dari pembaca, demi kebaikan penulisan selanjutnyaa dimasa yang akan datang. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kefarmasian.

Surakarta, 07 Juni 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
INTISARI.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Kegunaan Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Tanaman Binahong <i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis	4
1. Sistematika tanaman	4
2. Nama lain	4
3. Morfologi tanaman	5
4. Kandungan kimia tanaman	5
4.1 Alkaloid.....	5
4.2 Flavonoid	6
4.3 Saponin	6
4.4 Terpenoid	6
5. Khasiat dan kegunaan tanaman	7
6. Bagian tanaman yang digunakan	7
7. Perkembangan penelitian antibakteri daun binahong.....	7
B. Simplisia	8
1. Pengertian simplisia.....	8
2. Pemilihan simplisia.....	8
3. Pengeringan dan pencucian simplisia	9

C.	Metode Penyarian.....	9
1.	Ekstraksi.....	9
2.	Maserasi.....	9
3.	Fraksinasi.....	10
4.	Pelarut.....	10
4.1	Etanol.....	11
4.2	<i>n</i> -Heksana.....	11
4.3	Etil Asetat.....	11
4.4	Air.....	11
D.	Media.....	12
E.	Sterilisasi.....	12
F.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.	Sistematika <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2.	Morfologi dan Fisiologi Bakteri.....	13
3.	Identifikasi.....	14
4.	Toksin.....	14
G.	Antibakteri.....	15
H.	Antibiotik.....	16
I.	Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri.....	16
1.	Metode difusi.....	16
2.	Metode dilusi.....	17
J.	Landasan Teori.....	17
K.	Hipotesis.....	18
BAB III METODE PENELITIAN.....		19
A.	Populasi dan Sampel.....	19
B.	Variabel penelitian.....	19
1.	Identifikasi variabel utama.....	19
2.	Klasifikasi variabel utama.....	19
3.	Definisi operasional variabel utama.....	20
C.	Bahan dan Alat.....	21
1.	Bahan.....	21
2.	Alat.....	21
D.	Jalannya Penelitian.....	22
1.	Determinasi tanaman.....	22
2.	Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk.....	22
3.	Kandungan lembab daun binahong.....	22
4.	Pembuatan ekstrak etanol metode maserasi dan penetapan persen rendemen.....	22
5.	Uji bebas etanol ekstrak daun binahong.....	23
6.	Fraksinasi dari ekstrak etanol daun binahong.....	23
7.	Identifikasi kandungan kimia pada serbuk dan ekstrak daun binahong.....	23
7.1.	Identifikasi flavonoid.....	23
7.2.	Identifikasi alkaloid.....	24
7.3.	Identifikasi saponin.....	24

7.4. Identifikasi triterpenoid dan steroid	24
8. Sterilisasi.....	24
9. Pembuatan suspensi bakteri uji	24
10. Identifikasi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853..	24
10.1 Identifikasi makroskopis dengan cawan tuang	24
10.2 Identifikasi mikroskopis dengan perwarnaan Gram	25
Uji biokimia	25
Uji biokimia menggunakan media SIM.....	25
Uji biokimia menggunakan media KIA.....	26
Uji biokimia menggunakan media LIA	26
Uji biokimia menggunakan media Citrat.....	26
12. Pengujian aktivitas antibakteri	26
13. Analisis hasil	28
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	31
1. Hasil determinasi tanaman binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (ten.) Steenis).....	31
2. Hasil pembuatan serbuk daun binahong	31
3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong	32
4. Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun binahong.....	32
5. Hasil identifikasi kandungan kimia daun binahong	33
6. Hasil uji bebas etanol	33
7. Hasil fraksinasi	34
7.1. Fraksi <i>n</i> -heksana.	34
7.2. Fraksi etil asetat dan air.	34
8. Hasil identifikasi bakteri <i>pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	35
9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun binahong	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	43
A. Kesimpulan.....	43
B. Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tanaman binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	4
Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis).....	28
Gambar 3. Skema uji <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 dengan metode difusi	29
Gambar 4. Skema uji <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 dengan metode dilusi	30

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong	31
Tabel 2. Hasil penetapan kadar air serbuk binahong	32
Tabel 3. Persentase bobot ekstrak maserasi daun binahong	32
Tabel 4. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun binahong secara kualitatif	33
Tabel 5. Hasil tes bebas etanol ekstrak daun binahong	33
Tabel 6. Rendemen fraksi <i>n</i> -heksana daun binahong	34
Tabel 7. Rendemen fraksi etil asetat dan fraksi air daun binahong	35
Tabel 8. Hasil identifikasi biokimia <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853...	36
Tabel 9. Diameter hambat pada uji antibakteri daun binahong terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara difusi	37
Tabel 10. Hasil uji dilusi fraksi air dan gentamisin	41

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman binahong.....	50
Lampiran 2. Tanaman dan serbuk daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	51
Lampiran 3. Serangkaian proses maserasi	52
Lampiran 4. Penetapan kadar air serbuk daun binahong dan uji bebas alkohol ekstrak binahong.....	54
Lampiran 5. Alat dan reagen uji identifikasi kandungan senyawa kimia	55
Lampiran 6. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak	56
Lampiran 7. Fraksinasi <i>n</i> -heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air	57
Lampiran 8. Ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air	58
Lampiran 9. Alat oven, inkubator dan vortex	59
Lampiran 10. Hasil identifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	60
Lampiran 11. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong	62
Lampiran 12. Rendemen ekstrak etanolik daun binahong	63
Lampiran 13. Hasil perhitungan rendemen fraksinasi	64
Lampiran 14. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan air metode difusi	65
Lampiran 15. Pembuatan larutan stok dilusi.....	66
Lampiran 16. Perhitungan pengujian dosis antibiotik gentamisin.....	68
Lampiran 17. Hasil uji aktivitas antibakteri metode difusi.....	70
Lampiran 18. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air metode dilusi.....	73
Lampiran 19. Hasil uji aktivitas antibakteri gentamisin metode dilusi.....	74
Lampiran 20. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air metode dilusi.....	75
Lampiran 21. Hasil uji aktivitas antibakteri gentamisin metode dilusi.....	76

Lampiran 22. Komposisi media	77
Lampiran 23. Hasil analisis data uji ANOVA antara fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, ekstrak etanolik dengan konsentrasi 50%, 40%, 30%, kontrol (+), dan kontrol (-).....	80

INTISARI

WULANDARI D. Y., 2017, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) adalah salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan untuk mengobati luka bakar. Luka bakar pada kulit rentan terkena infeksi oleh bakteri Gram positif maupun Gram negatif seperti *P. aeruginosa*. Tujuan dari penelitian ini adalah pertama, mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun binahong terhadap bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853. Kedua, mengetahui fraksi teraktif sebagai antibakteri terhadap bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853. Ketiga, mengetahui KHM dan KBM dari fraksi teraktif daun binahong sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Ekstraksi serbuk daun binahong menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, selanjutnya proses fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dengan konsentrasi 50%, 40%, 30% untuk menentukan fraksi teraktif dan metode dilusi untuk menentukan KHM dan KBM dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,5%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,095%. Analisis statistik menggunakan ANOVA *oneway* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antara sediaan uji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air memiliki aktivitas antibakteri. Fraksi teraktif yaitu fraksi air pada konsentrasi 50% dengan zona hambat 18,25 mm. Hasil uji dilusi fraksi air menunjukkan aktivitas antibakteri dengan KBM pada konsentrasi 12,5%.

Kata Kunci : Daun binahong, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

ABSTRACT

WULANDARI D.Y, 2017, ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF N-HEXAN, ETHYL ACETATE, AND WATER FRACTION ETHANOL EXTRACT OF BINAHONG (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) LEAVES ON *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) is a plant that can be used to treat burns. Burns on the skin can make a person to get an infection from Gram-negative or Gram-positive bacteria like *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The purpose of this study, first, to know antibacterial activity of *n*-hexane, ethyl acetate, and water fraction from ethanol extract of binahong leaves on *P. aeruginosa*. Second, to know the fraction that having the most active antibacterial activity on *P. aeruginosa*. Also, to know MIC and MBC from the most active fraction as antibacterial on *P. aeruginosa*.

The extraction method of binahong leaves powder used maseration method with 70% ethanol. The fractionation process used *n*-hexane, ethyl acetate and water. Concentrations in difussion method were 50%, 40%, 30% to determine the most active fraction and dilution method to determine the MIC and MBC with concentrations of 50%, 25%, 12,5%, 6,5%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,095%. Data was analyzed using oneway ANOVA.

The result of this study showed that ethanol extract, *n*-hexane, ethyl acetat, and water fraction have antibacterial activity. The most active fraction is water fraction at concentration of 50% which has inhibition zone diameter 18,25 mm. Dilution result showed that water fraction had MBC 12,5%.

Keywords: : Binahong leaves, *n*-hexan fraction, ethyl acetate fraction, water fraction, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pengobatan tradisional dengan memanfaatkan tumbuhan berkhasiat obat merupakan pengobatan yang diakui masyarakat dunia (Wijayakusuma 2000). Seiring dengan perkembangan zaman perhatian masyarakat telah kembali ke bahan alami yang dikenal dengan istilah *back to nature*. Sejak dahulu masyarakat telah percaya bahwa bahan alam mampu mengobati segala jenis penyakit dan relatif aman bagi tubuh. Alternatif pengobatan yang sesuai standar medis, praktis, dan ekonomis perlu dikembangkan, seperti aplikasi pengobatan dengan memanfaatkan bahan-bahan alam. Pengobatan tradisional telah lama digunakan dan merupakan bagian integral dari budaya suatu daerah (Permatasari *et al.* 2015).

Dzen (2003) menjelaskan bahwa untuk mengatasi infeksi karena bakteri, antibiotika mempunyai peranan penting. Antibiotika diharapkan mampu mengeliminasi bakteri penyebab infeksi. Tetapi perlu disadari bahwa upaya mengeliminasi bakteri penyebab saja tidak cukup memadai, hal tersebut antara lain dimungkinkan akibat kurang tepatnya pemilihan antibiotika, munculnya resistensi, efek dari berbagai mediator dan sitokin, ikut mempengaruhi laju perjalanan infeksi. Luka adalah rusaknya kesatuan atau komponen jaringan, yang menyebabkan secara spesifik terdapat substansi jaringan yang rusak atau hilang. Ketika luka timbul, beberapa efek akan muncul diantaranya adalah hilangnya seluruh atau sebagian fungsi organ, respon stres simpatis, perdarahan dan pembekuan darah, kontaminasi bakteri, dan kematian sel. Penyembuhan luka pada kulit menggambarkan prinsip-prinsip perbaikan untuk sebagian besar jaringan tubuh pada luka superfisial. Epitel akan dibangun kembali dan hanya terdapat sedikit pembentukan luka parut (Robbins *et al* 2008).

Bakteri normal pada kulit manusia antara lain *Staphylococcus pidermis*, *S. aureus*, *Micrococcus sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Acinetobacter*, *P. aeruginosa*, *Candida sp.*, dan lain-lain. Bakteri-bakteri normal tersebut dapat bersifat patogen pada kondisi tertentu, misal iritasi atau luka bakar. Luka bakar pada kulit

membuat seseorang rentan terkena infeksi oleh bakteri Gram positif maupun Gram negatif seperti *P. aeruginosa* (Jawetz *et al.* 2012).

Infeksi *P. aeruginosa* sering terdapat dalam jumlah sedikit dalam flora normal usus. Pertumbuhan bakteri sangat mudah terjadi dan dapat menimbulkan penyakit kulit atau infeksi pada manusia. Salah satu penyebab terjadinya penyakit kulit adalah pola hidup yang kurang bersih. Penyakit kulit seperti kudis, bisul, borok dapat disebabkan oleh *P. aeruginosa* dan *S. aureus*. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri penghasil nanah dan terdapat pada kulit, kelenjar kulit dan selaput lendir. *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri Gram negatif, dapat menyebabkan 10-20% infeksi nosokomial, infeksi pada saluran napas bawah, saluran kemih, mata dan lain-lain. Bakteri ini dapat diisolasi dari penderita luka neoplastik, luka bakar berat dan juga penyakit metabolik (Jawetz *et al.* 1986).

Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) adalah salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan untuk mengobati banyak penyakit diantaranya, untuk pengobatan luka bakar, penyakit tifus, radang usus, sariawan, keputihan, pembengkakan hati, pembengkakan jantung, meningkatkan vitalitas dan daya tahan tubuh (Manoi, 2009). Menurut penelitian yang dilakukan Rochani (2009), yaitu ekstraksi dengan cara maserasi daun binahong dengan menggunakan pelarut petroleum eter, etil asetat dan etanol, setelah dilakukan uji tabung ditemukan kandungan alkaloid, saponin, dan flavonoid, sedangkan pada analisis secara KLT ditemukan senyawa alkaloid, saponin, dan flavonoid.

Menurut Ainurrochma *et al* (2013) efektivitas ekstrak daun binahong terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* strain BW 1201 dengan metode sumuran dapat disimpulkan, bahwa ekstrak daun binahong dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* strain BW 1201. Konsentrasi optimal ekstrak daun binahong yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* strain BW 1201 adalah konsentrasi 100% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 27,2 mm. Penelitian yang dilakukan Darsana *et al* (2012) bahwa perasan daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* secara *in vitro* dan meningkatnya

konsentrasi perasan daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) meningkatkan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* secara *in vitro*.

B. Perumusan Masalah

Permasalahan yang dihadapi yaitu :

Pertama, apakah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853?

Kedua, diantara ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) manakah yang mempunyai aktivitas antibakteri teraktif terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853?

Ketiga, berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) sebagai antibakteri terhadap ATCC 2785?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini ialah:

1. Mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853.
2. Mengetahui aktivitas antibakteri yang teraktif dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.
3. Mengetahui KHM dan KBM dari fraksi teraktif daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang khasiat daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) sebagai antibakteri khususnya terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853, sehingga dapat digunakan sebagai pengobatan infeksi bakteri.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Binahong *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis

1. Sistematika tanaman

Klasifikasi secara lengkap dari tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) sebagai berikut :

- Kingdom : Plantae
- Subkingdom : Tracheobionta
- Superdivisio : Spermatophyta
- Divisio : Magnoliophyta
- Class : Magnoliopsida
- Sub-class : Hamamelidae
- Ordo : Caryophyllales
- Familia : Basellaceae
- Genus : *Anredera* `
- Spesies : (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Depkes RI (2006)



Gambar 1. Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) (Mus 2008)

2. Nama lain

- Nama Ilmiah : *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis
- Nama Daerah : *gondola* (Sunda); *gendola* (Bali); *lembayung* (Minangkabau); *genjerot*, *gedrek*, *uci-uci* (Jawa); *kandula* (Madura); *tatabuwe* (Sulawesi Utara); *poiloo* (Gorontalo); *kandola* (Timor)
- Nama Asing : heartleaf maderavine madevine (Inggris) dan dheng s han chi (Cina) (Hariana 2002).

3. Morfologi tanaman

Tanaman binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) merupakan tanaman menjalar, berumur panjang (perennial), bisa mencapai panjang ± 5 m (Smith 2006).

Batang lunak, silindris, saling membelit, berwarna merah, bagian dalam solid, permukaan halus, kadang membentuk semacam umbi yang melekat di ketiak daun dengan bentuk tidak beraturan dan bertekstur kasar.

Daun tunggal, bertangkai sangat pendek (*subsessile*) tersusun berseling, berwarna hijau, benyuk jantung (*cordata*), panjang 5-10 cm, lebar 3-7 cm, helaian daun tipis lemas, ujung runcing, pangkal berlekuk (*emarginatus*), tepi rata, permukaan licin.

Bunga majemuk berbentuk tandan, bertangkai panjang, muncul di ketiak daun, mahkota berwarna krem keputih-putihan berjumlah lima helai tidak berlekatan, panjang helai mahkota 0,5-1 cm, berbau harum, akar berbentuk rimpang, berdaging lunak (Manoi 2009).

4. Kandungan kimia tanaman

Rachmawati (2007) telah melakukan skrining fitokimia daun Binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan melakukan maserasi terhadap serbuk kering daun dengan menggunakan pelarut *n*-heksana dan metanol didapatkan kandungan kimia berupa saponin triterpenoid, flavonoid, dan minyak atsiri. Rochani (2009), melakukan ekstraksi dengan cara maserasi daun binahong dengan menggunakan pelarut petroleum eter, etil asetat dan etanol, setelah dilakukan uji tabung ditemukan kandungan alkaloid, saponin, dan flavonoid, sedangkan pada analisis secara KLT ditemukan senyawa alkaloid, saponin, dan flavonoid.

Tanaman Binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) mengandung alkaloid, saponin, dan polifenol, sedangkan umbinya mengandung alkaloid dan antrakuinon (Depkes RI 2006). Didalam tanaman binahong terkandung senyawa kuersetin (Yang *et al* 2008). Kuersetin ini merupakan salah satu zat aktif kelas flavonoid dari kelompok flavonol (Waji dan Sugrani 2009).

4.1 Alkaloid. Alkaloid adalah zat yang mengandung nitrogen biasanya dalam bentuk heterosiklik dalam ikatan primer, sekunder, tersier atau kuarterner bersifat basa, mempunyai khasiat fisiologi tertentu yang jelas, umumnya berasa

pahit. Senyawa alkaloid memiliki mekanisme penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel mikroorganisme, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Senyawa alkaloid terdapat gugus basa yang mengandung nitrogen akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel. Reaksi ini mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino, sehingga akan menimbulkan perubahan keseimbangan genetik pada rantai DNA sehingga mendorong terjadinya lisis sel mikroba yang akan menyebabkan kematian sel pada mikroba (Nimah *et al.* 2012).

4.2 Flavonoid. Senyawa flavonoid diturunkan dari unit C₆-C₃ (fenil propana) yang bersumber dari asam sikimat (via fenilalanin) unit C₆ yang diturunkan dari jalur poliketida. Flavonoid pada tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid (Harborne 2007). Senyawa flavonoid merupakan golongan fenol, diduga mekanisme kerjanya dengan mendenaturasikan protein sel dan merusak membran sel mikroorganisme. Flavonoid akan mendenaturasi protein sel dan mengerutkan dinding sel sehingga melisiskan dinding sel jamur karena flavonoid akan membentuk kompleks dengan protein membran sel. Pembentukan kompleks menyebabkan rusaknya membran sel karena terjadi perubahan permeabilitas sel dan hilangnya kandungan isi sel di dalam sitoplasma yang mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel (Anggara *et al.* 2014).

4.3 Saponin. Saponin dibedakan sebagai saponin terpenoid dan saponin steroid. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika dikocok dalam air. Saponin dikenal sebagai senyawa *non-volatile* dan sangat larut air dingin maupun panas (Chapagain dan L. Heng 2005). Saponin bekerja dengan menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intrasel akan keluar sehingga bakteri dapat mati (Ngajow *et al.* 2013).

4.4 Terpenoid. Terpenoid adalah semua senyawa yang terbentuk dari satuan isoterpen. Senyawa terpenoid merupakan senyawa hidrokarbon yang dibedakan berdasarkan jumlah satuan isoprena penyusunnya, group metil, dan

atom oksigen yang diikatnya (Robinson 1995). Terpenoid tumbuhan mempunyai manfaat penting sebagai obat tradisional, antibakteri, antijamur, dengan gangguan kesehatan (Thomson 2008). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan dengan mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel dan menyebabkan membran atau dinding sel tidak terbentuk sempurna (Ajizah 2004). Adanya sifat hidrofobik atau lipofilik pada senyawa terpenoid kemungkinan menyebabkan kerusakan sitoplasmik membran, koagulasi sel, dan terjadinya gangguan proton pada sel jamur (Natta *et al.* 2008).

5. Khasiat dan kegunaan tanaman

Menurut Manoi (2009), secara empiris tanaman binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Beberapa penyakit yang dapat disembuhkan dengan menggunakan tanaman ini adalah : kerusakan ginjal, diabetes, pembengkakan jantung, muntah darah, stroke, tifus, wasir, rematik, radang usus, sembelit, sesak napas, sariawan berat, pusing, sakit perut, asam urat, keputihan, dan pembengkakan hati. Selain itu tanaman binahong juga dapat digunakan untuk pemulihan pasca operasi, pemulihan pasca melahirkan, menyembuhkan luka dalam, melancarkan dan menormalkan peredaran dan tekanan darah, menyuburkan kandungan, meningkatkan vitalitas dan daya tahan tubuh.

6. Bagian tanaman yang digunakan

Tanaman binahong yang digunakan dalam pengobatan berasal dari akar, batang, daun, dan bunga maupun umbi yang menempel pada ketiak daun. Penggunaan tanaman binahong untuk pengobatan secara empiris adalah 5 gram daun kering (Manoi 2009).

7. Perkembangan penelitian antibakteri daun binahong

Penelitian yang dilakukan Kartika *et al* (2016) dengan judul potensi ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) sebagai penghambat bakteri *Vibrio harveyi*, menunjukkan hasil penggunaan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) dengan konsentrasi yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* secara *in vitro*. Ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) dengan konsentrasi 3%, 5%, 7%, 9%, 11% dan

13% hanya bersifat bakteriostatik yaitu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* dengan konsentrasi terbaik yang didapatkan yaitu sebesar 13%.

Umar *et al* (2012) melakukan penelitian dengan judul pengaruh pemberian ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap kesembuhan luka infeksi *Staphylococcus aureus* pada mencit. Hasil penelitian didapatkan bahwa penggunaan ekstrak etanol daun binahong selama 7 hari sama dengan penggunaan antimikroba asam fusidat dalam penyembuhan luka pada mencit yang terinfeksi *S. aureus*.

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia merupakan bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibedakan menjadi simplisia nabati, hewani, dan pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan adalah isi sel yang secara spontan keluar dari selnya atau senyawa nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa senyawa murni (Depkes RI 2000).

Dasar pembuatan simplisia meliputi beberapa tahap yaitu dimulai dari pengumpulan bahan baku, sortasi basah, pencucian, pengubahan bentuk, pengeringan, sortasi kering, pengepakan, dan penyimpanan (Gunawan dan Mulyani 2004).

2. Pemilihan simplisia

Proses pemilihan simplisia digunakan untuk memisahkan simplisia dari benda asing yang berbahaya atau tidak berbahaya dalam jumlah kecil atau besar yang biasanya merugikan. Simplisia nabati harus bebas dari serangga, fragmen hewan atau kotoran hewan, tidak boleh menyimpang bau dan warnanya, tidak boleh mengandung lendir dan cendawan atau menunjukkan tanda-tanda pengotoran lain, tidak boleh mengandung bahan lain yang beracun atau berbahaya (Isdanto 2011).

3. Pengeringan dan pencucian simplisia

Bahan tanaman yang sudah dikumpul dilakukan pencucian pada air yang mengalir. Pencucian berguna untuk membersihkan tanaman dari kotoran yang melekat pada bahan simplisia. Pencucian ini dilakukan dengan air bersih, misalnya air dari mata air, air sumur dari PAM. Bahan simplisia yang mengandung zat yang mudah larut dalam air yang mengalir, pencucian hendaknya dilakukan dalam waktu yang sesingkat mungkin (Depkes RI 2000).

Tujuan pengeringan simplisia adalah untuk menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri. Pengeringan bahan simplisia dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu pengeringan di bawah sinar matahari dan pengeringan teduh. Kelemahan pengeringan di bawah sinar matahari adalah membutuhkan suhu dan kelembaban yang tidak terkontrol, membutuhkan tempat yang luar dan terbuka sehingga kemungkinan terjadi kontaminasi mikroba lebih besar. Pengeringan ditempat teduh biasanya digunakan untuk bahan baku simplisia yang kandungan utamanya minyak atsiri atau senyawa lain yang sifatnya termolabil (Depkes 2008).

C. Metode Penyarian

1. Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif tersebut berada di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya (Akhyar 2010).

2. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan (Depkes RI 2000).

Maserasi berasal dari bahasa latin *macerace* berarti mengairi dan melunakan. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Selama maserasi atau proses perendaman dilakukan pengocokan berulang-ulang. Upaya ini menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat didalam cairan. Sedangkan keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolut. Semakin besar perbandingan simplisia terhadap cairan pengestraksi, akan semakin banyak hasil yang diperoleh (Voigt 1994).

Kerugian dari maserasi adalah pengerjaannya lama, membutuhkan pelarut yang banyak dan penyarian kurang sempurna. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Depkes RI 2000).

3. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan suatu cara untuk memisahkan golongan utama dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolaran suatu senyawa. Senyawa yang bersifat polar misal glikosida jantung, glikosida flavonoid, glikosida saponin, dan tanin akan terlarut dalam pelarut polar, senyawa yang bersifat nonpolar yaitu *n*-butanol, metnol, etanol, asam asetat, isopropanol, *n*-propanol dan asam format, air akan terlarut dalam pelarut nonpolar. Senyawa-senyawa yang bersifat semipolar misal alkalioid, senyawa fenolik, asam fenolat, flavonoid juga akan masuk ke pelarut semi polar, yang termasuk pelarut semi polar yaitu etil asetat, aseton. Contoh pelarut nonpolar yaitu *n*-heksana, kloroform, benzena, karbon tetraklorida, dietil eter (Harborne 1996).

Fraksinasi bertingkat umumnya diawali dengan pelarut yang kurang polar dan dilanjutkan dengan pelarut yang lebih polar. Tingkat polaritas pelarut dapat ditentukan dari nilai konstanta dielektrik pelarut. Empat tahapan fraksinasi bertingkat dengan menggunakan empat macam pelarut yaitu ekstraksi etanol, fraksinasi *n*-heksana, etil asetat dan air.

4. Pelarut

Pemilihan larutan penyari juga harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara kimia dan fisika, beraksi netral, selektif yaitu

menarik zat berkhasiat, tidak mempengaruhi zat berkhasiat. Cairan penyari atau pelarut ada tiga macam yaitu pelarut polar, semi polar dan nonpolar, contoh cairan penyari adalah etanol, *n*-heksana, etil asetat dan air (Depkes 2005).

4.1 Etanol. Etanol merupakan pelarut serba guna untuk ekstraksi pendahuluan. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, pelarut ini tidak menyebabkan pembengkakan membran sel, memperbaiki stabilitas bahan obat pelarut. Keuntungan lainnya adalah sifat untuk mengendapkan bahan putih keluar dan menghambat kerja enzim. Etanol 70% biasanya menghasilkan suatu bagan aktif yang optimal, dimana bahan pengotornya hanya dalam skala kecil larut dalam cairan pengeksraksinya (Voigt 1994). Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kumarin, flavonoid, antrakuinon, steroid, dan klorofil. Etanol dipertimbangkan sebagai larutan penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman kulit tidak dapat tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorbsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air pada skala perbandingan, panas diperlukan lebih sedikit (Depkes 2005).

4.2 *n*-Heksana. Pelarut *n*-heksana merupakan pelarut nonpolar berupa cairan yang jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar, dan mempunyai bau seperti ester atau petrolium, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksana yaitu senyawa yang bersifat nonpolar seperti terpenoid, triterpenoid, sterol, lemak, asam lemak, alkaloid, karotenoid, klorofil dan resin (Depkes 2005).

4.3 Etil Asetat. Etil asetat merupakan pelarut semi polar, mudah terbakar dan menguap, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas. Etil asetat merupakan suatu cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah, larut 15 bagian air, dapat tercampur dalam eter, etanol dan kloroform. Senyawa yang larut dalam pelarut ini adalah flavonoid (Harborne 2007).

4.4 Air. Pelarut yang digunakan sebagai larutan polar adalah air. Pelarut air adalah pelarut yang sangat polar digunakan untuk menyari senyawa-senyawa

organik polar sehingga cocok digunakan untuk pelarut polar dalam proses fraksinasi. Pemekatan yang dapat dilakukan dengan diuapkan dengan tangas air menggunakan penangas air. Pelarut air dipilih karena air dapat melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tanin, gula, gom, pati, protein, lender, enzim, lilin, lemak, pektin, zat warna asam organik. Kekurangan menggunakan air adalah zat aktif yang tersaji juga zat lain yang tidak diperlukan atau bahkan dapat menggunakan proses pembuatan sari seperti gom, pati, protein, lemak, enzim, lender, dan lain-lain. Air juga merupakan tempat tumbuh bagi kuman, kapang, dan khamir (Depkes RI 2005).

D. Media

Media adalah tempat bagi jaringan untuk tumbuh dan mengambil nutrisi yang mengandung kehidupan jaringan. Media tumbuh menyediakan berbagai bahan yang diperlukan jaringan untuk hidup memperbanyak diri. Media yang diperlukan untuk menumbuhkan mikroba mempunyai persyaratan tertentu, yaitu media harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba. Media harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba. Media harus dalam keadaan steril artinya sebelum ditanami mikroba yang dimaksud, tidak ditumbuhi oleh mikroba lain (Abdurahman 2008).

Konsistensi media dapat dibuat bermacam-macam berdasarkan pada keperluannya. Media terdapat tiga bentuk yaitu media cair, padat, dan setengah padat. Media cair (*liquid media*) dapat digunakan pembiakan organisme dalam jumlah besar, fermentasi dan berbagai uji. Media padat (*solid media*) digunakan untuk mengamati bentuk dan morfologi koloni serta mengisolasi biakan murni. Media setengah padat (*semisolid media*) digunakan untuk menguji ada atau tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi (Sriyanti dan Wijayani 2008).

E. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang dipergunakan dalam bidang mikrobiologi harus dalam keadaan steril. Steril artinya tidak didapatkan mikroba yang tidak

diharapkan kehadirannya, baik yang mengganggu atau merusak media atau mengganggu kehidupan dan proses yang sedang dikerjakan (Waluyo 2004).

Sterilisasi harus dapat membunuh jasad renik yang paling tahan panas seperti bakteri. Sterilisasi dengan autoklaf biasanya disebut sterilisasi basah atau sterilisator uap. Dengan pemanasan di dalam autoklaf maka bakteri dan mikrobia dapat mati pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Metode selain dengan menggunakan sterilisasi basah juga dapat menggunakan metode lainnya seperti perebusan, tindalisasi, pasteurisasi, pemanasan kering, radiasi, radiasi ionisasi, penyaringan, dan lain-lain (Fardiaz 2001).

Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah dan kering, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar x, sinar α , dan sinar UV untuk bahan yang tidak aktif akan berubah akibat temperatur tinggi atau tekanan tinggi. Sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin dan sterilisasi secara mekanik yaitu penggunaan saringan atau filter untuk bahan yang akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi mengalami perubahan atau penguraian (Darmandi 2008).

F. *Pseudomonas aeruginosa*

1. Sistematika *Pseudomonas aeruginosa*

Sistematika bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dalam taksonomi sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Order	: Pseudomonadales
Family	: Pseudomonadaceae
Genus	: Pseudomonas
Species	: Pseudomonas aeruginosa (Brook <i>et al.</i> 2001).

2. Morfologi dan Fisiologi Bakteri

Bakteri *P. aeruginosa* termasuk dalam famili Pseudomonadaceae. Bakteri ini merupakan bakteri Gram-negatif, mempunyai flagel tunggal yang bersifat

polar atau terkadang terdiri atas 2-3 flagel, dan mempunyai ukuran 0,5-1 μm x 3-4 μm . Bila ditumbuhkan pada perbenihan tanpa sukrosa, bakteri ini dapat memproduksi lapisan lendir polisakarida ekstraseluler. Galur yang diisolasi dari bahan klinik sering kali mempunyai pili yang berperan penting dalam pelekatan pada permukaan sel dan resistensi bakteri terhadap fagositosis.

Pseudomonas aeruginosa sering kali dihubungkan dengan penyakit yang ditularkan secara nosokomial pada manusia, yaitu infeksi yang didapat di rumah sakit. Bakteri ini sering diisolasi dari penderita luka dan luka bakar yang berat. Selain dapat menyebabkan infeksi pada kulit, mata, atau telinga, *P. aeruginosa* dapat menyebabkan infeksi pada saluran napas bagian bawah, saluran kemih, dan organ lain (Radji 2010).

3. Identifikasi

Pseudomonas aeruginosa dapat tumbuh dalam lingkungan yang sangat kekurangan sumber energi, bahkan dapat hidup dan tumbuh dalam air suling. Bakteri ini dapat menggunakan asetat sebagai sumber karbon dan amonia sebagai sumber nitrogen. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan satu-satunya bakteri yang menghasilkan pigmen piosianin, yang berwarna biru kehijauan dan dapat larut dalam kloroform, dan pigmen fluoresen, pioverdin, yang larut dalam air (Radji 2010).

Pseudomonas aeruginosa tumbuh dengan baik pada suhu 37-42°C, bersifat oksidase-positif. *Pseudomonas aeruginosa* tidak memfermentasi karbohidrat, tetapi banyak galur yang mengoksidasi glukosa (Jawetz *et al.* 2012). *Pseudomonas aeruginosa* diidentifikasi dengan pewarnaan Gram, tidak meragi laktosa, memberikan reaksi oksidase positif, dan dapat tumbuh pada suhu 42°C. Koloni *P. aeruginosa* berbau seperti buah-buahan dan berwarna spesifik (Radji 2010).

4. Toksin

Pada infeksi luka bakar akan terbentuk nanah yang berwarna buru-hijau yang disebabkan oleh *P. aeruginosa*. Infeksi saluran kemih terjadi karena adanya *P. aeruginosa* yang terdapat dalam kateter dan alat-alat atau dalam larutan irigasi.

Infeksi lokal kuman ini dapat menyebar melalui darah, sehingga dapat menyebabkan septisemia dan lesi lokal pada jaringan lain (Jawetz *et al.* 2005).

Pseudomonas aeruginosa dapat mensintesis toksin dan enzim yang mematikan bagi manusia. Lipid A (endotoksin) berada di dinding sel dari bakteri merupakan zat penyebab demam, vasodilatasi, inflamasi dan gejala lain. Eksotoksin A dan eksoenzim S dapat menghambat sintesis protein sel eukariot yang menyebabkan kematian sel. *Pseudomonas aeruginosa* juga memiliki enzim elastase yang dapat mempunyai efek histotoksik dan mempermudah invasi organisme ini ke dalam pembuluh darah (Bauman 2007).

G. Antibakteri

Menurut Ganiswara (2005) mekanisme kerja antimikroba terbagi atas lima kelompok yaitu :

Pertama, mengganggu metabolisme sel mikroba. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoate (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Apabila asam folat tidak ada, maka sel-sel tidak dapat tumbuh dan membelah. Antimikroba akan berkompetisi dengan PABA untuk membentuk asam folat, jika senyawa antimikroba yang menang bersaing dengan PABA, maka akan terbentuk asam folat non fungsional yang akan mengganggu kehidupan mikroorganisme.

Kedua, menghambat sintesis dinding sel mikroba. Dinding sel bakteri terdiri dari polipeptida yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis.

Ketiga, mengganggu permeabilitas membran sel mikroba. Membran sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain.

Keempat, menghambat sintesis protein sel mikroba. Bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein sehingga dihasilkan protein yang abnormal.

Kelima, menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel mikroba. Antimikroba yang memiliki mekanisme kerja ini pada umumnya bersifat sitotoksik kurang selektif terhadap sel tubuh hospes maka masih dapat diterima sebagai antimikroba.

H. Antibiotik

Gentamisin merupakan antibiotik golongan aminoglikosida. Aminoglikosida merupakan kelompok antibiotik yang gula aminonya tergabung dalam ikatan glikosida. Antibiotik ini memiliki spektrum luas dan bersifat bakterisidal dengan mekanisme penghambatan pada sintesis protein. Antibiotik ini berikatan pada subunit 30S ribosom bakteri (terikat juga pada subunit 50S ribosom) dan menghambat translokasi peptida-tRNA dari situs A ke situs P, dan menyebabkan kesalahan pembacaan mRNA dan mengakibatkan bakteri tidak mampu menyintesis protein vital untuk pertumbuhannya. Contohnya adalah gentamisin yang berasal dari *Micromonospora* yang efektif untuk infeksi *Pseudomonas* (Pratiwi 2008).

I. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri

1. Metode difusi

Metode difusi adalah suatu uji aktifitas dengan menggunakan cakram kertas, sumuran atau silinder tidak beralas. Metode dengan sumuran atau silinder dilakukan dengan memasukkan larutan uji dengan konsentrasi tertentu dalam sumuran. Diameter zona hambat yang terbentuk disekitar sumuran digunakan untuk mengukur kekuatan hambatan obat (Jawetz *et al.* 2012).

2. Metode dilusi

Metode dilusi adalah metode menggunakan antibakteri dengan kadar yang menurun secara bertahap baik dengan media cair atau padat. Kemudian media diinokulasi bakteri uji dan diinkubasi. Tahap akhir dilarutkan antibakteri dengan kadar yang menghambat dan mematikan. Keuntungan metode dilusi adalah diketahui KHM dan KBM. Bahan uji pada metode dilusi cair lebih mudah berinteraksi dengan bakteri karena suspensi bakteri tersebar merata sehingga metode ini lebih peka. Kekurangan metode ini adalah memerlukan waktu relatif lebih lama (Jawetz *et al.* 2012).

J. Landasan Teori

Bagian daun tanaman binahong mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid dan saponin dimana salah satu komponen tersebut dapat menghambat bakteri. Ainurrochma dkk (2013), berdasarkan analisis dan pembahasan data hasil penelitian mengenai efektivitas ekstrak daun binahong terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *S. flexneri* strain BW 1201 dengan metode sumuran dapat disimpulkan, bahwa ekstrak daun binahong dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. flexneri* strain BW 1201. Konsentrasi optimal ekstrak daun binahong yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. flexneri* strain BW 1201 adalah konsentrasi 100% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 27,2 mm.

Penelitian yang dilakukan Darsana dkk 2012 menyatakan bahwa perasan daun binahong (*A. Cordifolia* (Ten.) Steenis) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* secara *in vitro* pada konsentrasi 100%. Peningkatan konsentrasi perasan daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) meningkatkan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* secara *in vitro*.

Senyawa-senyawa yang terdapat pada daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) dapat berperan sebagai antibakteri. Menurut Juliantina dkk. (2008) alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri spektrum luas, antioksidan, antiplasmodial, antikanker dan antimutagenik. Flavonoid berperan sebagai antibakteri dengan merusak lipid pada membran plasma sehingga isi sel keluar (Pratiwi 2008). Saponin merupakan senyawa yang diduga sebagai senyawa

antibakteri karena memiliki kemampuan dalam menghambat fungsi membran sel sehingga merusak permeabilitas membran yang mengakibatkan dinding sel rusak atau hancur (Ayuningtyas 2008). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan dengan mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel dan menyebabkan membran atau dinding sel tidak terbentuk sempurna (Ajizah 2004).

Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kumarin, flavonoid, antrakuinon, steroid, dan klorofil (Depkes 2005). Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksana yaitu senyawa yang bersifat nonpolar seperti terpenoid, triterpenoid, sterol, lemak, asam lemak, alkaloid, karotenoid, klorofil dan resin (Depkes 2005). Etil asetat merupakan suatu cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah, larut 15 bagian air, dapat tercampur dalam eter, etanol dan kloroform. Senyawa yang larut dalam pelarut ini adalah flavonoid (Harborne 2007). Pelarut air dapat melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tanin, gula, gom, pati, protein, lender, enzim, lilin, lemak, pektin, zat warna asam organik (Depkes RI 2005).

K. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini ialah :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, fraksi air dari daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) mempunyai aktivitas antibakteri teraktif terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Ketiga, dapat ditentukan KHM atau KBM dari fraksi teraktif daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) yang diperoleh di daerah Palur, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) yang diambil pada bulan Januari 2016 secara acak kemudian dibuat ekstrak daun binahong. Tanaman daun binahong yang diambil memiliki daun yang masih muda, berwarna hijau, diambil dari tanaman yang masih segar, dan terbebas dari hama.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah ekstrak dan fraksi-fraksi daun binahong yang dimaserasi dengan etanol 70% dilanjutkan dengan fraksinasi yang menggunakan *n*-heksana, etil asetat dan air.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun binahong terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun binahong dengan berbagai konsentrasi atau fraksi ekstrak etanol daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) diuji antibakteri dengan berbagai konsentrasi.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 dimedia uji.

Variabel terkendali pada penelitian ini merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853, kondisi laboratorium (meliputi kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril) dan media yang digunakan dalam penelitian harus steril.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, adalah daun binahong yang diambil berwarna hijau segar dan diambil secara acak, yang diperoleh dari daerah Palur, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun binahong adalah daun binahong yang sudah dipetik kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, setelah itu daun yang sudah dicuci bersih dikeringkan dengan oven pada suhu 40⁰C, kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan nomer 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun binahong adalah hasil ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, hasil maserasi yang didapat kemudian dipekatkan.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah hasil fraksinasi dari ekstrak etanol 70% daun binahong dengan fraksinasi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut nonpolar.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksi yang diperoleh dari residu fraksi *n*-heksana dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar.

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

Ketujuh, adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Univeritas Setia Budi.

Kedelapan, metode difusi adalah uji aktivitas antibakteri dengan konsentrasi 50%, 40% dan 30% (Maghfiroh dan Ainy, 2014). Metode difusi menggunakan media MHA dalam cawan petri yang mempunyai diameter dan ketebalan media tertentu. MHA diratakan permukaannya dengan menggunakan suspensi bakteri uji yang kemudian dioleskan pada permukaan media MHA sampai rata kemudian meletakkan cakram diatas media yang berisi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air serta kontrol negatif DMSO 1% dan kontrol positif gentamisin, lalu mengamati diameter zona hambat.

Kesembilan, metode dilusi adalah dengan menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yaitu berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%. Kontrol negatif adalah fraksi teraktif dan kontrol positif adalah suspensi bakteri.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah daun binahong, alkohol, asam klorida, pelarut amil alkohol, larutan HCl 2%, larutan dragendorf, etil asetat, anhidrida asetat, dan H₂SO₄ pekat. Bakteri uji yang digunakan adalah *P. aeruginosa* ATCC 27853 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA), *Kigler Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Sulfide Indol Motilitas* (SIM), Citrat. Bahan kimia yang digunakan adalah pelarut etanol 70%, *n*-heksana, etil asetat, aquadest steril, larutan standart Mc Farland 0,5.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa oven, alat penggiling, ayakan nomer 40, botol coklat, gelas ukur, Erlenmeyer, batang pengaduk, tabung reaksi, corong kaca, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, Beaker glass, corong pisah, penangas uap, kertas saring, alat *Rotary Evaporator*, *waterbath*,

timbangan analitik, autoklaf, *moisture* balance, inkubator, inkas, ose, kapas lidi, cawan petri, pipet volume, pipet tetes, pipet ukur, lampu spirtus, labu destilasi, kertas saring, dan disk cakram.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah determinasi tanaman yang digunakan dalam penelitian yaitu tanaman binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis). Determinasi ini dilakukan di Universitas Sebelas Maret. Determinasi dan deskripsi ini bertujuan untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi baik secara makroskopi maupun mikroskopi tanaman binahong (*A. cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap kepustakaan yang dibuktikan di laboratorium.

2. Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

Daun binahong dicuci bersih di bawah air mengalir, ditiriskan. Daun binahong yang sudah bersih, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 45°C untuk mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Daun binahong yang kering dihaluskan dengan mesin penggiling kemudian diayak dengan ayakan nomor 40.

3. Susut pengeringan daun binahong

Penetapan susut pengeringan daun binahong dilakukan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Caranya temperatur diatur yaitu pada suhu 105 °C dan waktu auto kemudian sampel serbuk daun binahong 2 gram dimasukkan dalam neraca timbang saat skala 0,00. Alat *Moisture Balance* akan berbunyi dan menunjukkan hasil dalam satuan persen (%). Konsentrasi air akan memenuhi syarat apabila konsentrasi air suatu serbuk simplisia tidak lebih dari 10%.

4. Pembuatan ekstrak etanol metode maserasi dan penetapan persen rendemen

Pembuatan ekstrak maserasi daun binahong: serbuk simplisia sebanyak 400 gram dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat, menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 10:75. Maserasi dilakukan selama lima hari sambil

sesekali digojog, kemudian disaring menggunakan kain flanel dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai terbentuk ekstrak kental. Penetapan persen rendemen diperoleh dari hasil ekstrak pekat, kemudian hasil dari ekstrak pekat dibagi dengan berat serbuk lalu dikalikan 100 %.

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

5. Uji bebas etanol ekstrak daun binahong

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara ekstrak yang telah pekat diuji dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, dinyatakan bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol.

6. Fraksinasi dari ekstrak etanol daun binahong

Fraksinasi dari ekstrak etanol daun binahong yang telah dikentalkan dengan cara diambil sepuluh gram ekstrak etanol kental dari hasil maserasi di dalam beaker glass kemudian dilarutkan dengan pelarut air panas 75 mL, difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebanyak tiga kali dengan masing-masing 75 mL, fraksi *n*-heksana yang didapat dipekatkan. Residu yang didapat dari fraksi *n*-heksana dilanjutkan fraksinasi tiga kali dengan pelarut etil asetat masing-masing 75 mL. Hasil yang didapat adalah fraksi etil asetat yang didapat diuapkan dengan *Rotary Evaporator*, dan fraksi air kemudian dipekatkan dengan *waterbath* sampai pekat lalu ditimbang.

7. Identifikasi kandungan kimia pada serbuk dan ekstrak daun binahong

Identifikasi senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam ekstrak daun binahong. Identifikasi dilakukan dengan uji tabung. Identifikasi kandungan senyawa kimia dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

7.1. Identifikasi flavonoid. Ekstrak, fraksi teraktif sebanyak 0,5 gram ditambah 10 ml aquadest dipanaskan selama satu menit, diambil filtratnya. Filtrat ditambah 0,1 gram larutan Mg, ditambahkan 1 ml pelarut amil alkohol. Campuran dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan

dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamisyah 2014).

7.2. Identifikasi alkaloid. Ekstrak, fraksi teraktif sebanyak 0,5 g ditambahkan sedikit larutan HCl 2 N, dipanaskan kemudian tambahkan reagen Dragendrof terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam (Alamisyah 2014).

7.3. Identifikasi saponin. Ekstrak, fraksi teraktif sebanyak 0,5 gram ditambah air panas lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Saponin positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm, pada penambahan 1 tetes HCl 2 N buih tidak hilang (Alamisyah 2014).

7.4. Identifikasi triterpenoid dan steroid. Ekstrak dan fraksi teraktif masing-masing sebanyak 2 mL diuapkan dalam cawan porselin. Residu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Asam sulfat pekat sebanyak 2 mL selanjutnya ditambahkan melalui dinding tabung. Terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Ciulei, 1984)

8. Sterilisasi

Media agar yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Beaker glass, gelas ukur, tabung reaksi, cawan petri disterilkan dengan oven pada suhu 170-180° C selama 2 jam, sedangkan alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung dan inkas dengan menggunakan formalin (Jawetz *et al.* 2012).

9. Pembuatan suspensi bakteri uji

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

10. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

10.1 Identifikasi makroskopis dengan cawan tuang. Bakteri uji *P. aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasikan pada medium PSA dan diinkubasi

selama 18-24 jam pada suhu 37° C. Penampakan membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen yang berwarna kehijauan (Jawetz *et al.* 2007).

10.2 Identifikasi mikroskopis dengan perwarnaan Gram. Pewarnaan Gram berguna untuk dapat menyakinkan bahwa bakteri *P. aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif. Perbedaan respon terhadap mekanisme pewarnaan gram pada bakteri menurut Pelczar & Chan (1986) adalah didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif mengandung protein dan Gram negatif mengandung lemak dalam persentasi lebih tinggi dan dinding selnya tipis. Pewarnaan Gram dimulai dengan pemberian zat warna dasar, kristal violet. Larutan iodin diberikan selanjutnya, seluruh bakteri akan terwarnai biru pada tahap ini dalam proses pewarnaan. Kemudian bakteri diberikan alkohol. Bakteri Gram positif akan tetap mempertahankan kompleks kristal violet-iodin sehingga tetap berwarna ungu, bakteri Gram negatif benar-benar hilang warnanya oleh alkohol. Sebagai langkah akhir, zat warna lawan, safranin (pewarna merah) diberikan sehingga bakteri Gram negatif yang tidak berwarna akan berwarna merah sedangkan bakteri Gram positif akan tetap berwarna ungu (Jawetz *et al.* 2012). Pemberian alkohol (etanol) pada pewarnaan bakteri, menyebabkan terekstraksi lipid sehingga memperbesar permeabilitas dinding sel. Pewarnaan safranin masuk ke dalam sel dan menyebabkan sel menjadi berwarna merah pada bakteri gram negatif sedangkan pada bakteri gram positif dinding selnya terdehidrasi dengan perlakuan alkohol, pori-pori mengkerut, daya rembes dinding sel dan membran menurun sehingga pewarna safranin tidak dapat masuk sehingga sel berwarna ungu (Pelczar & Chan 1986).

10.3 Uji biokimia. *P. aeruginosa* dapat diketahui sifat fisiologisnya dengan inokulasi pada media-media uji biokimia. Macam media yang digunakan inokulasi bakteri uji *P. aeruginosa* adalah KIA, LIA, SIM, Citrat. Masing-masing media tersebut diinokulasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Hasilnya dapat diketahui dengan perubahan warna masing-masing media atau dengan penambahan reagen.

Uji biokimia menggunakan media SIM. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam

pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfid, indol, dan motilitas bakteri. Sulfide positif bila media berwarna hitam. Uji indol positif bila terbentuk cincin warna merah setelah ditambah reagen Erlich yang berisi paradimetil amino bensaldehid. Pembentukan cincin indol karena pemecahan asam amino triptopan oleh enzim triptopanase menjadi indol & asam pyruvat sehingga menunjukkan bakteri memakai triptopan sebagai salah satu sumber karbon. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media.

Uji biokimia menggunakan media KIA. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan gores kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Hasil pada bagian lereng dan dasar berwarna merah yang berarti basa (ditulis K), atau kuning yang berarti suasana asam (ditulis A), terbentuk gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media ditulis (S+).

Uji biokimia menggunakan media LIA. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan gores kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi lisin dan sulfida. Pengamatan dilakukan pada lereng dan dasar media serta adanya sulfida. Hasil pada bagian lereng dan dasar dapat berwarna merah coklat (ditulis R), berwarna ungu berarti suasana basa (ditulis K) atau berwarna kuning yang berarti suasananya asam (ditulis A), terbentuk warna hitam pada media berarti sulfida positif (ditulis S+).

Uji biokimia menggunakan media Citrat. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan gores kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru.

11. Pengujian aktivitas antibakteri

Hasil ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun binahong yang didapatkan diuji secara mikrobiologi terhadap *P. aeruginosa*. Metode yang digunakan adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi untuk mengetahui

diameter zona hambat dan metode dilusi digunakan untuk mengetahui KHM dan KBM.

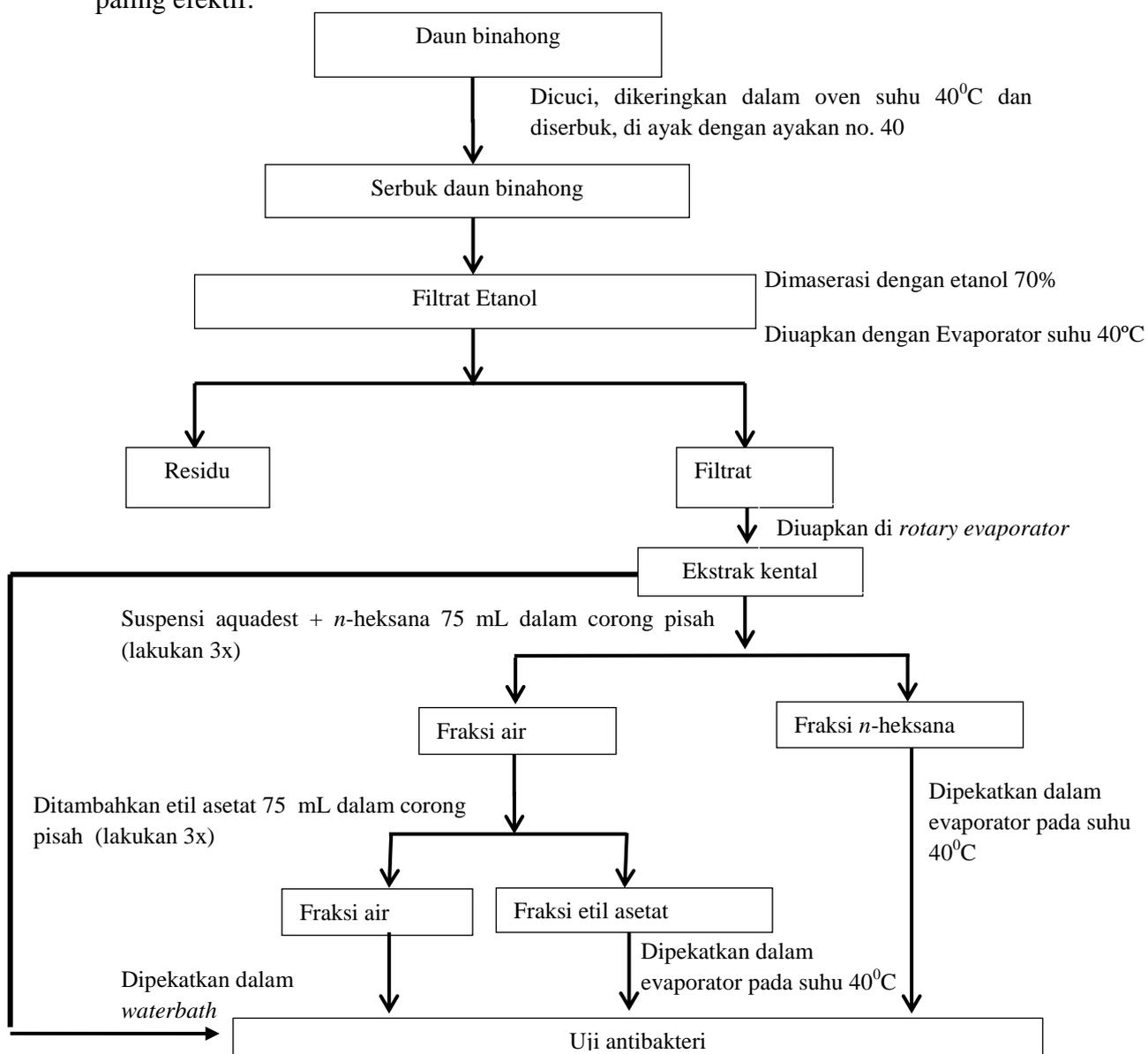
Metode difusi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dibuat masing-masing tiga konsentrasi yaitu 50%, 40% dan 30% menggunakan pengencer DMSO 1%. Bakteri uji yang sudah disiapkan, kemudian diinokulasi merata pada media MHA 30 ml dengan menggunakan kapas lidi steril kemudian didiamkan selama 10 menit agar suspensi biakan terdifusi ke media. Mengambil 30 µl ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air kemudian diteteskan dalam cakram kosong dan didiamkan selama 5 menit. Cakram dari semua konsentrasi kemudian diletakkan di atas media, sebagai kontrol positif diletakkan pula cakram gentamisin dan sebagai kontrol negatif diletakkan pula cakram yang telah diteteskan DMSO 1%. Masa inkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam kemudian dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat yang terbentuk. Setelah ditemukan konsentrasi diameter daya hambat terbesar dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air, dilanjutkan pengujian antibakteri metode dilusi.

Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung yang terdiri dari 12 tabung dengan konsentrasi 50% ,25%, 12,5%, 6,5%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,095%, kontrol positif (+) adalah suspensi bakteri *P. aeruginosa* dan kontrol negatif (-) adalah fraksi daun binahong. Medium BHI 0,5 mL dimasukkan ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptis dari tabung kedua sampai ke tabung kesebelas, dan tabung pertama ditambahkan 1 mL BHI. Fraksi teraktif dimasukkan ke dalam tabung kedua sebanyak 0,5 mL lalu dari tabung kedua diambil 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung ketiga dan begitu seterusnya sampai tabung kesebelas. Suspensi bakteri dalam medium BHI dimasukkan ke dalam tabung uji kedua sampai kesebelas sebanyak 0,5 mL dan tabung kedua belas 1 mL sebagai kontrol positif . Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, lalu diamati kekeruhannya. KHM ditentukan dengan mengamati adanya kekeruhan pada seri pengenceran sejumlah tabung yang telah diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam, dimana tabung dengan larutan jernih setelah tabung keruh terakhir merupakan KHM. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media MHA diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati ada tidaknya

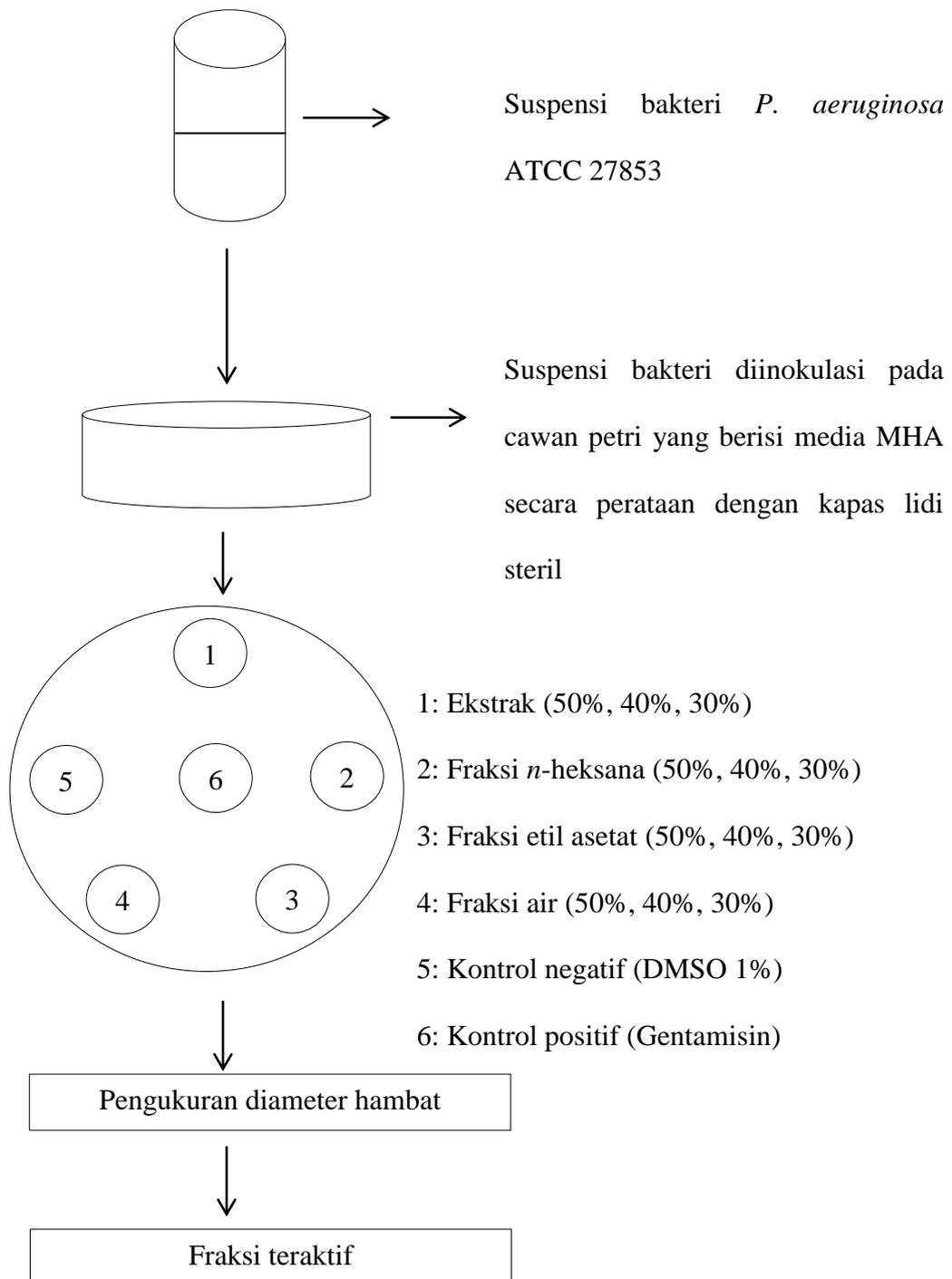
pertumbuhan bakteri maka merupakan KBM. KHM ditentukan dari goresan terakhir yang masih terdapat pertumbuhan bakteri, sedangkan KBM ditentukan dari goresan bakteri yang sudah tidak terdapat pertumbuhan bakteri (Bonang dan Koeswardono 1982).

12. Analisis hasil

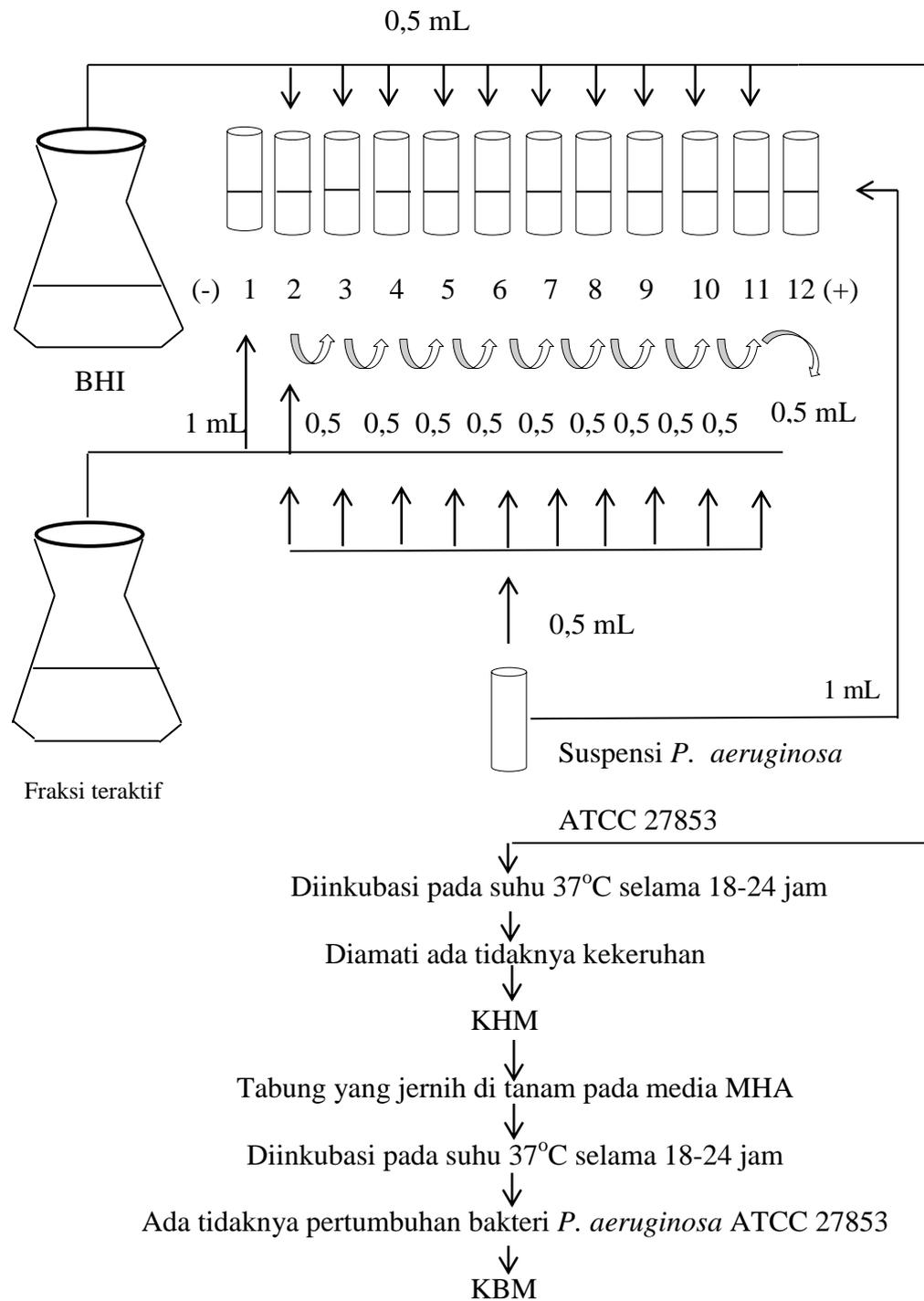
Hasil penelitian dianalisis berdasarkan pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 di tabung reaksi dan di media selektif. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan berdasarkan hasil pengamatan, dimana konsentrasi terkecil adalah konsentrasi paling efektif.



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).



Gambar 3. Skema uji *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode difusi.



Gambar 4. Skema uji *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode dilusi.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Hasil determinasi tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Determinasi daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Sebelas Maret Surakarta. Determinasi dilakukan untuk menetapkan kebenaran daun tanaman binahong yang akan digunakan dalam penelitian sebagai antibakteri,

Berdasarkan hasil determinasi dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). Hasil determinasi yang dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Hasil pembuatan serbuk daun binahong

Pembuatan serbuk daun binahong dilakukan dengan cara daun binahong dicuci bersih pada air mengalir agar terbebas dari kotoran dan debu, kemudian dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan dalam oven 40°C, digiling menjadi serbuk dan di ayak dengan ayakan nomor 40. Pemakaian ayakan no 40 bertujuan agar zat aktif yang terkandung dalam serbuk daun binahong secara optimal mungkin.

Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong dapat dilihat pada tabel 1. Pengeringan daun binahong dilakukan sebanyak 4000 gram bobot basah kemudian dikeringkan dan didapat bobot kering 900 gram, diperoleh rendemen bobot kering terhadap bobot basah adalah 22,5%^{b/b}. Perhitungan persentase bobot basah terhadap bobot kering dapat dilihat pada lampiran 11.

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong

Bobot Basah	Bobot Kering	Rendemen
4000 gram	900 gram	22,5%

3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong

Hasil penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak tiga kali replikasi menggunakan alat *Moisture Balance*. Tujuan dari penetapan susut pengeringan adalah untuk mengetahui besarnya kandungan air didalam simplisia yang akan digunakan dalam penelitian. Simplisia dinilai cukup aman bila angka susut pengeringannya kurang dari 10% untuk mencegah terjadinya pembusukan yang disebabkan oleh jamur, bakteri, dan mencegah perubahan kimiawi yang menurunkan mutu serbuk. Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan daun binahong adalah 7,4% artinya daun binahong sudah memenuhi syarat pengeringan simplisia karena kurang dari 10%.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk binahong

No.	Berat awal serbuk (g)	Kadar lembab (%)
1	2,00	7,5
2	2,00	7,3
3	2,00	7,4
Rata-rata		7,4

4. Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun binahong

Maserasi merupakan suatu penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari. Sebanyak 400 gram serbuk daun binahong direndam dalam pelarut etanol 70% dalam botol coklat dengan tujuan mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna. Pemilihan konsentrasi pelarut etanol 70% dikarenakan etanol 70% lebih bersifat polar dibandingkan pelarut etanol 96% atau etanol 95%. Pelarut yang telah dimasukkan ke dalam botol coklat dan sudah bercampur dengan serbuk daun binahong harus segera ditutup mengingat sifat pelarut etanol yang mudah menguap. Serbuk direndam dengan pelarut etanol 70% selama 5 hari dengan sesekali digojog dan didapat persentase rata-rata bobot ekstrak maserasi daun binahong adalah sebagai berikut :

Tabel 3. Persentase bobot ekstrak maserasi daun binahong

Serbuk (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%)
400	80,75	20,18

Persentase rendemen ekstrak maserasi daun binahong yang diperoleh sebanyak 20,18 %. Hasil perhitungan ekstrak daun binahong dapat dilihat pada lampiran 12.

5. Hasil identifikasi kandungan kimia daun binahong

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kandungan kimia yang terdapat pada daun binahong. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun binahong dapat dilihat pada tabel 4 lampiran 6.

Tabel 4. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun binahong secara kualitatif

Senyawa	Pengamatan	Hasil		Keterangan	
		Pustaka	Ekstrak	Fraksi air	
Flavonoid	Larutan berwarna merah pada lapisan amil alkohol	Reaksi positif bila timbul warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes 1978)	(+)	(+)	
Alkaloid	Terbentuk kekeruhan atau endapan warna coklat hitam dan ada endapan kuning	Kekeruhan atau endapan warna coklat (Depkes 1978)	(+)	(+)	
Saponin	Terdapat busa + HCl, busa tidak hilang selama 30 menit setinggi 2,5 cm	Terdapat busa yang mantap setinggi 1-5cm + HCl, busa tidak hilang selama 30 menit (Depkes 1978)	(+)	(+)	
Terpenoid	Terbentuk warna coklat kemerahan	Terbentuk warna coklat kemerahan	(+)	(-)	

Keterangan : + : memiliki
- : tidak memiliki

6. Hasil uji bebas etanol

Ekstrak daun binahong dilakukan tes bebas etanol dengan uji esterifikasi. Hasil tes bebas etanol ekstrak daun binahong dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil tes bebas etanol ekstrak daun binahong

Hasil	Pustaka
Tidak tercium bau ester	Tidak tercium bau ester (Depkes RI, 1995)

Hasil tes bebas etanol pada tabel 5 menunjukkan bahwa ekstrak daun binahong sudah bebas dari etanol yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol. Guna hasil tes bebas etanol adalah untuk membuktikan bahwa ekstrak daun binahong sudah tidak mengandung etanol.

7. Hasil fraksinasi

Fraksinasi merupakan suatu cara untuk memisahkan golongan utama dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolaran suatu senyawa. Senyawa kimia alam yang terkandung di dalam tumbuhan berupa senyawa metabolit sekunder yaitu triterpen/steroid, flavonoid, tanin, saponin, kumarin, alkaloid, glikosida dan lain sebagainya. Golongan triterpenoid/ steroid merupakan senyawa yang larut dalam pelarut non polar seperti *n*-heksan, sedangkan golongan alkaloid termasuk senyawa semi polar yang dapat larut dalam pelarut semi polar. Sedangkan senyawa flavonoid dan tanin dapat larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol, etil asetat atau pelarut polar lainnya (Harborne 1984).

Penyarian awal adalah dilakukan maserasi dengan pelarut etanol 70% sehingga didapat ekstrak. Ekstrak kemudian difraksi dan diharapkan selektifitas dari pelarut dalam menarik komponen bahan aktif sesuai dengan kepolarannya. Senyawa non polar akan terekstraksi dalam pelarut *n*-heksana, senyawa semipolar akan terekstraksi dalam pelarut etil asetat dan senyawa polar akan terekstraksi dalam pelarut air.

7.1. Fraksi *n*-heksana. Hasil sediaan ekstrak maserasi yang telah dipisahkan ditimbang 10 gram kemudian disuspensikan dengan air sebanyak 75 ml lalu dipisahkan di corong pisah dengan menambahkan *n*-heksana 75 ml, sehingga didapat fraksi *n*-heksana. Residu yang didapat dilakukan fraksinasi lanjutan dengan pelarut etil asetat. Berikut ini adalah tabel rendemen hasil fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana.

Tabel 6. Rendemen fraksi *n*-heksana daun binahong

Bobot ekstrak etanolik	Bobot fraksi	Rendemen (%)
30 gram	2,35	7,83

Perhitungan persentase rendemen fraksi *n*-heksana daun binahong didapat persentase 7,83%. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana daun binahong dapat dilihat pada lampiran 13.

7.2. Fraksi etil asetat dan air. Residu dari fraksinasi *n*-heksana dipisahkan di corong pisah dengan menambahkan etil asetat 75 ml, sehingga

didapat fraksi etil asetat dan air. Berikut ini adalah tabel rendemen hasil fraksinasi etil asetat dan hasil fraksinasi air.

Tabel 7. Rendemen fraksi etil asetat dan fraksi air daun binahong

Bobot ekstrak etanolik (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%)
30	2,63	8,76
30	7,83	26,1

Perhitungan persentase rendemen fraksi etil asetat daun binahong didapat persentase 8,76% dan fraksi air didapat persentase 26,1%. Hasil perhitungan rendemen fraksi etil asetat dan air daun binahong dapat dilihat pada lampiran 13.

Hasil fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibandingkan fraksi yang lain karena sebagian besar senyawa dalam daun binahong bersifat polar. Rendemen setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun binahong berbeda. Hasil rendemen yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu 100% atau mendekati 100%. Hal tersebut kemungkinan disebabkan ekstrak banyak yang menempel pada wadah dan corong pisah, serta kurangnya kekentalan ekstrak untuk proses fraksinasi.

8. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* atcc 27853

Pertama, identifikasi *P. aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasikan pada medium *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ditunjukkan dengan penampakan koloninya yaitu koloni bulat halus dengan membentuk pigmen yang berwarna kehijauan karena mengandung piosianin.

Kedua, identifikasi *P. aeruginosa* ATCC 27853 secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dimulai dengan pemberian zat warna dasar, kristal violet (Gram A), selanjutnya diberikan larutan iodin (Gram B) sehingga seluruh bakteri akan berwarna ungu pada tahap ini. Kemudian sel diberikan alkohol (Gram C). Sel Gram positif akan tetap mempertahankan kompleks kristal violet-iodin sehingga tetap berwarna ungu, sel Gram negatif

benar-benar hilang warnanya oleh alkohol. Selanjutnya diberikan zat warna lawan, safranin (Gram D/pewarna merah) sehingga *P. aeruginosa* ATCC 27853 akan berwarna merah. Hal ini dapat disebabkan karena dinding sel bakteri gram negatif tidak tebal dibandingkan dengan bakteri Gram positif sehingga saat diberikan safranin maka bakteri tersebut akan berwarna merah. Hasil uji dengan pewarnaan gram dapat dilihat pada lampiran 10.

Ketiga, identifikasi *P. aeruginosa* ATCC 27853 secara biokimia. Hasil identifikasi bakteri uji *P. aeruginosa* ATCC 27853 secara biokimia dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil identifikasi biokimia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Uji	Hasil	Pustaka (Bonang & Koeswardono 1982)
SIM	-- +	-- +
KIA	K/K S-	K/K S-
LIA	K/K S-	K/K S-
CITRAT	+	+

Keterangan :

SIM : Sulfida Indol Motility

KIA : Kliger Iron Agar

LIA : Lysin Iron Agar

K : Basa (alkali)

S : Sulfida

+ : Reaksi positif

- : Reaksi negatif

Identifikasi secara biokimia pada media SIM, memberikan hasil --+, artinya uji sulfida negatif karena media kuning, setelah penambahan 3 tetes reagen Erlich A dan B tidak terbentuk cincin merah muda pada permukaan media, berarti uji indol negatif, uji motilitas positif ditunjukkan dengan adanya penyebaran pertumbuhan bakteri di media SIM. Media KIA menunjukkan hasil ^k/_kS-, berarti bakteri tidak memfermentasi glukosa dan laktosa, bagian lereng berwarna merah (K), bagian dasar berwarna(K), S- artinya uji sulfida menunjukkan tidak adanya pembentukan warna hitam pada media KIA. Media LIA diperoleh hasil ^k/_kS-, bagian lereng media berwarna ungu (K), bagian dasar berwarna ungu, S- menunjukkan bahwa sulfida negatif karena *P. aeruginosa* tidak menghasilkan H₂S dan mendeaminasi lisin. Media citrat positif, ditandai dengan adanya warna biru

pada media citrat. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa bakteri yang dipakai dalam penelitian adalah *P. aeruginosa*. Hasil uji identifikasi bakteri *P. aeruginosa* dapat dilihat pada lampiran 10.

9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun binahong

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dan metode dilusi. Metode difusi dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui zona hambat dan metode dilusi untuk mendapatkan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif. Fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun binahong diuji pada bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853. Metode difusi konsentrasi 50%, 40%, 30% dan pembandingan kontrol positif gentamisin, kontrol negatif DMSO 1%. Suspensi bakteri uji yang digunakan dalam penelitian disesuaikan kekeruhannya dengan standart kekeruhan Mc Farland 0,5. Metode difusi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan disk cakram, langkah dalam metode difusi yaitu disk kosong ditetaskan larutan uji sebanyak 30 µl. Masa inkubasi selama 23-48 jam pada suhu 37°C. Perhitungan uji difusi dapat dilihat pada lampiran 14.

Tabel 9. Diameter zona hambat pada uji antibakteri daun binahong terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara difusi

Sampel	Konsentrasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata (mm) ± SD
		Replikasi			
		I	II	III	
Fraksi <i>n</i> -heksana	50%	8,5	8,0	8,2	8,23± 0,25
Fraksi Etil asetat	50%	14,0	14,3	14,0	14,1 ± 0,17
Fraksi Air	50%	18,5	18,0	18,7	18,25± 0,35
Ekstrak	50%	16,0	16,2	16,5	16,23 ± 0,25
Fraksi <i>n</i> -heksana	40%	7,0	7,8	7,5	7,43 ± 0,40
Fraksi Etil asetat	40%	13,0	12,7	13,0	12,9±0,17
Fraksi Air	40%	16,8	16,0	16,5	16,43±0,40
Ekstrak	40%	15,0	14,5	14,8	14,76±0,25
Fraksi <i>n</i> -heksana	30%	0	0	0	0 ± 0
Fraksi Etil asetat	30%	0	0	0	0 ± 0
Fraksi Air	30%	9,5	10,0	9,0	9,5±0,5
Ekstrak	30%	0	0	0	0 ± 0
Kontrol (+)	4%	37,0	35,0	37,0	36,33±1,15
Kontrol (-)	1%	0	0	0	0 ± 0

Keterangan :
 Kontrol (-) : DMSO 1%
 Kontrol (+) : Gentamisin 4%

Hasil uji pada tabel 10 menunjukkan hasil penelitian bahwa fraksi air memiliki daya hambat yang lebih efektif dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan ekstrak etanol terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853. Pada tabel 10 diatas bahwa fraksi air dan kontrol positif (gentamisin) lebih efektif dalam menghambat *P. aeruginosa* ATCC 27853. Hasil rata-rata diameter zona hambat fraksi air yang paling besar yaitu pada konsentrasi 50% sebesar 18,25 mm, lalu pada konsentrasi 40% yaitu sebesar 16,43 mm, dan pada konsentrasi 30% zona hambatnya 9,5 mm. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi ini menggunakan kontrol negatif DMSO 1%.

Davis dan Stout (1971) menyatakan bahwa apabila zona hambat yang terbentuk pada uji difusi agar berukuran kurang dari 5 mm, aktivitas penghambatan dikategorikan lemah. Apabila zona hambat berukuran 5-10 mm dikategorikan sedang, 10-19 mm dikategorikan kuat dan 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat.

Hasil diameter zona hambat antibakteri metode difusi yang dilakukan dalam penelitian ini yang termasuk sedang yaitu fraksi *n*-heksana pada konsentrasi 50% (8,23mm), 40% (7,43 mm), dan fraksi air pada konsentrasi 30% (9,5 mm). Daya hambat antibakteri termasuk kuat yaitu fraksi etil asetat pada konsentrasi 50% (14,1 mm), 40 % (12,9 mm), dan fraksi air pada konsentrasi 50% (18,25 mm), 40% (16,43 mm). Daya hambat antibakteri termasuk lemah yaitu fraksi *n*-heksana 30% (0 mm), fraksi etil asetat 30% (0 mm).

Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi setelah diketahui zona hambatnya dilanjutkan dengan menganalisis data yang diuji secara statistik Analisis of Varian (ANOVA) *oneway*. Data yang dianalisis ANOVA *oneway* pada konsentrasi 50%, 40%, dan 30% ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air daun binahong, kontrol positif dan kontrol negatif. Data yang dihasilkan nantinya untuk membandingkan hubungan antara ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, dan kontrol positif sehingga dapat diketahui apakah ada perbedaan yang signifikan diantara beberapa fraksi dan kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini.

Hasil uji pertama yang dilihat yaitu *One-Sample Kolmogorove-Sminov* untuk menentukan apakah diperoleh signifikansi $> 0,05$ maka H_0 diterima, hasil dari *One-Sample Kolmogorove-Sminov* $0,248 > 0,05$ maka H_0 diterima. Disimpulkan data tersebut mengikuti distribusi normal sehingga dapat dilakukan analisis variansi (ANOVA). Hasil uji *oneway* ANOVA tabel diameter hambat diperoleh $F = 1816,126$ dengan probabilitas $0,000 < 0,05$ artinya dari tiap sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Berdasarkan tabel Tukey HSD terdapat tanda * pada *Mean Difference*, tanda tersebut menunjukkan bahwa perbedaan diameter antara sampel uji yang digunakan untuk menghambat aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Hasil analisis Tukey test dan Bonferroni test dapat dilihat pada lampiran 23.

Hasil dari *Homogeneous Subsets* terbagi dalam 8 subset, bagian ini untuk mencari grup/subset mana saja yang mempunyai perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Disimpulkan bahwa sampel yang tergabung dalam satu grup maka tidak mempunyai perbedaan yang nyata, sedangkan sampel yang tidak dalam satu subset artinya mempunyai perbedaan yang nyata. Tabel *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada lampiran 23.

Hasil uji statistik yang dilakukan dari penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi air yang memiliki aktivitas antibakteri lebih optimal dalam menghambat *P. aeruginosa* ATCC 27853 jika dibandingkan dengan ekstrak, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat karena dalam fraksi air, zat yang tersari di dalamnya yaitu flavonoid, alkaloid dan saponin. Ekstrak memiliki aktivitas antibakteri lebih optimal daripada fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana dalam menghambat *P. aeruginosa* ATCC 27853 karena ekstrak etanol mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun binahong, namun senyawa-senyawa tersebut tidak mampu bekerja secara sinergis sehingga daya hambat yang terbentuk lebih kecil daripada zona hambat yang terbentuk oleh fraksi air. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas lebih optimal dibandingkan fraksi *n*-heksana dalam menghambat *P. aeruginosa* karena fraksi etil asetat mampu menarik senyawa flavonoid, namun belum bisa bekerja dengan baik dalam menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Saponin merupakan glikosida yang larut dalam air dan etanol. Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteri lisis, jadi mekanisme kerja saponin termasuk dalam kelompok antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida (Mardiana, 2013).

Senyawa flavonoid memiliki kemampuan membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu keutuhan membran sel. Mekanisme kerjanya dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel dan tidak dapat diperbaiki lagi (Cowan 1999, diacu dalam Juliantina 2008). Flavonoid juga menyebabkan perubahan pada membran sel bakteri yang diikuti dengan masuknya air yang tidak terkontrol kedalam sel bakteri, hal ini menyebabkan pembengkakan sel bakteri dan akhirnya membran sel menjadi pecah. Pecahnya membran tersebut mengakibatkan kematian sel bakteri (Black dan Jacobs 1993, diacu dalam Kusdarwati *et al* 2010).

Senyawa alkaloid memiliki mekanisme penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Robinson 1991, diacu dalam Juliantina 2008). Selain itu, Gunawan (2009) menyatakan bahwa didalam senyawa alkaloid terdapat gugus basa yang mengandung nitrogen dan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel bakteri dan DNA bakteri. Reaksi ini mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino, sehingga akan menimbulkan perubahan keseimbangan genetik pada rantai DNA sehingga akan mengalami kerusakan akan mendorong terjadinya lisis sel bakteri yang akan menyebabkan kematian pada sel bakteri.

Kontrol positif terbukti efektif dalam menghambat bakteri ditunjukkan dengan zona hambat yang paling besar dibandingkan fraksi yang teraktif. DMSO 1% digunakan dalam pengenceran fraksi karena DMSO 1% tidak terdapat

aktivitas antibakteri. Fraksi yang memiliki aktivitas paling optimal adalah fraksi air.

Pengujian antibakteri selanjutnya menggunakan metode dilusi, fraksi yang diujikan yaitu fraksi teraktif yang memiliki zona hambat besar di uji antibakteri dengan metode difusi sebelumnya. Metode dilusi berguna untuk mencari Konsentrasi hambat minimum dan Konsentrasi bunuh minimum menggunakan sediaan fraksi paling aktif yaitu fraksi air daun binahong. Seri konsentrasi yang digunakan yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,5%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, dan 0,09%, kontrol positif dan kontrol negatif. Gentamisin yang digunakan sebagai pembanding dalam metode difusi juga dilakukan pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian gentamisin dimulai dari 4%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625%, 0,031%, 0,015%, 0,007% kontrol positif dan kontrol negatif. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi dapat dilihat pada tabel 10. Gambar hasil uji dilusi fraksi air dapat dilihat pada lampiran 18 dan uji dilusi gentamisin pada lampiran 19.

Tabel 10. Hasil uji dilusi fraksi air dan gentamisin

No	Konsentrasi (%)	Fraksi air Replikasi			Konsentrasi (%)	Gentamisin Replikasi		
		I	II	III		I	II	III
1	50	-	-	-	4	-	-	-
2	25	-	-	-	2	-	-	-
3	12,5	-	-	-	1	-	-	-
4	6,25	+	+	+	0,5	-	-	-
5	3,125	+	+	+	0,25	-	-	-
6	1,56	+	+	+	0,125	-	-	-
7	0,78	+	+	+	0,0625	+	+	+
8	0,39	+	+	+	0,031	+	+	+
9	0,19	+	+	+	0,015	+	+	+
10	0,09	+	+	+	0,007	+	+	+
11	K (+)	+	+	+	K (+)	+	+	+
12	K (-)	-	-	-	K (-)	-	-	-

Keterangan:

(+) = terdapat pertumbuhan bakteri

(-) = tidak terdapat pertumbuhan bakteri

Pengujian aktivitas antibakteri yang telah dilakukan yaitu dengan metode difusi dan metode dilusi, diketahui bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air mampu membunuh *P. aeruginosa* ATCC 27853 dilihat

dari hasil uji difusi. Hasil uji dilusi yaitu tidak adanya nilai KHM karena kekeruhan dari seri pengenceran sejumlah tabung yang telah diinkubasi menunjukkan kekeruhan yang tidak dapat dilihat karena adanya pengaruh dari warna fraksi air sebagai fraksi teraktif sehingga di lanjutkan dengan penggoresan pada media agar MHA untuk menentukan KBM, dimana ditentukan dari konsentrasi paling rendah yang tidak ditumbuhi koloni bakteri pada uji dengan metode dilusi dengan media MHA dan didapatkan hasil bahwa fraksi air dapat membunuh bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 pada konsentrasi 12,5%, dan dilakukan perbandingan antara fraksi air dan antibiotik gentamisin. Antibiotik gentamisin sebagai pembanding, apakah fraksi air memiliki aktivitas lebih baik dibandingkan antibiotik gentamisin sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853. Hasil aktivitas antibakteri yang telah dilakukan diketahui bahwa gentamisin mampu membunuh pada konsentrasi 0,125%, dengan demikian penggunaan antibiotik gentamisin masih lebih efektif digunakan masyarakat dibandingkan hasil dari ekstrak maupun fraksi daun binahong terhadap bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi air dari daun binahong belum mampu mengalahkan obat gentamisin. Mekanisme kerja gentamisin yaitu penghambatan pada sintesis protein. Konsentrasi bunuh minimum ditentukan dengan konsentrasi paling rendah yang tidak ditumbuhi koloni bakteri pada uji dengan metode dilusi.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak daun binahong terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, Fraksi air dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) merupakan fraksi teraktif terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Ketiga, fraksi air mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan konsentrasi bunuh minimum (KBM) pada konsentrasi 12,5%.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan uji aktivitas antibakteri daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan metode penyarian dan pelarut yang lain untuk mengetahui metode yang lebih efektif.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut fraksi lain daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap mikroorganisme lain yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurahman D. 2008. *Biologi Kelompok Pertanian dan Kesehatan*. Bandung: Grafindo Media Pratama.
- Ajizah A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap ekstrak daun *Psidium Guajava* L. *Jurnal Biologi Pertanian* 1:31-38.
- Ainurrochma A, Evie R, Lisa L. 2013. Efektivitas ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* dengan metode sumuran. *LenteraBio* 3: 233-237.
- Akhyar. 2010. Uji daya hambat dan analisis KLT biotautografi ekstrak akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa* Griff.) terhadap *Vibrio Harveyi* [Skripsi]. Makassar: Fakultas Farmasi, Universitas Hasanudin.
- Anggara ED, Suhartanti D, Mursyidi A. 2014. Uji aktivitas antifungi fraksi etanol infusa daun kepel (*Stelechocarpus burahol*, Hook F&Th.) terhadap *Candida albicans*. Yogyakarta: Universitas Ahmad Dahlan.
- Ayuningtyas A. K., 2008. Efektivitas campuran meniran (*Phyllanthus niruri*) dan bawang putih (*Allium sativum*) untuk pengendalian infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepenus*) [Skripsi]. Bogor: Prodi Teknologi dan Manajemen Akuakultur, Institut Pertanian Bogor.
- Bauman R. 2007. *Microbiology With Diseases by Taxonomy*. 2th edition. Pearson Educating Inc. San Fransisco.
- Black JM, and Jacobs EM. 1993. *Madical Surgical Nursing*. 4th edition. WB Saunders Company Philadephia pp. 373-387.
- Bonang G, dan Koeswardono. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium Dan Klinik*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2001. *Medical Microbiology*. New York: Mc Graw Hill.
- Chapagain BP dan Wiesman Z. 2005. Larvicidal activity of the fruit mesocarp extract of *Balanites aegyptiaca* and its saponin fractions against *Aedes aegypti*. *Dengue Bulletin* 29:85-88.
- Ciulei J. 1984. Methodology for Analysis of Vegetables and Drugs. Bucharest: Faculty of Pharmacy. Pp. 11-26.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents: *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 82-564.

- Darmandi. 2008. *Infeksi Nosokomial: Problematika dan Pengendaliannya*. Jakarta: Salemba Medika.
- Darsana IGO, Besung INK, Mahatmi H. 2012. Potensi daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. *Indonesia Medicus Veterinus* 1:337 – 351
- Davis WW, Stout TR. 1971. Disc plate methods of microbiological antibiotic assay. *Applied Microbiology* 22:666-670.
- [DepKes] Departemen Kesehatan. 1978. *Sediaan Galenik*. Jilid I. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- [DepKes] Departemen Kesehatan. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- [DepKes] Departemen Kesehatan. 2000. *Acuan Sediaan Herbal*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- [DepKes] Departemen Kesehatan. 2005. *Materia Medika Indonesia*. Jilid III. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- [DepKes] Departemen Kesehatan RI. 2006. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (VI)*. Jakarta: Departemen Kesehatan & Kesejahteraan Sosial RI.
- [DepKes] Departemen Kesehatan. 2008. *Pengelolaan Pasca Panen Tanaman Obat*. Balai Penelitian Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Dzen MR. 2003. *Bakteriologi Medik*. Edisi Pertama, Malang: Bayumedia.
- Fardiaz, Srikandi. 2001. *Mikrobiologi Pangan*. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.
- Ganiswara SG. 2005. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Jakarta : Gaya Baru.
- Gunawan IWA., 2009, Potensi buah pare (*Momordica charantia* L.) sebagai antibakteri *Salmonella typhimurii*, [Skripsi]. Denpasar: Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Mahasaraswati.
- Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)*. Jilid 1. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Harborne JB. 1984. *Phytochemical Method*. Chapman and Hall ltd. London.

- Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM. 2005. *Farmakognosi dan Fitoterapi*. Syarief WR, Aisyah C, Elviana E, Fidiyasi ER, penerjemah; Hadinata AH, editor. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari: *Fundamentals of pharmacognosy ang phytotherapy*.
- Hariana HA. 2002. *Tumbuhan Obat & Khasiatnya*. Edisi revisi. Jakarta :Penebar Swadaya.
- Isdanto M. 2011. *Proses produksi jamu kapsul Herbatas di CV Herbairama persada Yogyakarta Bantul Yogyakarta* [Karya Tulis Ilmiah]. Surakarta: Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret.
- Jawetz, Ernest, MD. PhD dkk, 1986. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan*. Edisi 16, Jakarta : Buku Kedokteran. Hlm 299-301.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2005. *Medical Microbiology*, 23th Ed. Elferia Nr, penerjemah; Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG.
- Jawetz E, Melnick JL. Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Edisi 25. Boning G, penerjemah; Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG.
- Juliantina F, Dewa ACM, Bunga N, Titis N, Endrawati TB. 2008. Manfaat sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai agen antibakterial terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*.
- Kartika GRA, Andayani S, Soelistyowati. 2016. Potensi ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) sebagai penghambat bakteri *Vibrio harvey*. *Journal of Marine and Aquatic Sciences* 2(2), 49-53.
- Kusdarwati R, Sari L, Mukti AT. 2010. Daya antibakteri ekstrak buah adas (*Foeniculum vulgare*) terhadap bakteri *Micrococcus luteus* secara in vitro. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan* 2: 34.
- Maghfirloh, Ainy EQ. 2014. Uji aktivitas antibakteri ekstrak bunga *Jasminum Sambac Ait* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Shigella Flexneri* ATCC 1202. *Biologi, Sains, Lingkungan, dan Pembelajarannya*. Yogyakarta: UIN Sunan Kalijaga.
- Manoi F, Balitro. 2009. *Binahong (Anredera cordifolia) sebagai obat*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Mardiana L. 2013. *Daun Ajaib*. Jakarta: Penebar Suwadaya.

- Mus. 2008. Informasi spesies binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). www.plantamor.com/spcdetail.php?recid=1387. [11 November 2016].
- Natta L, Opapin, Karttika dan Pantip. 2008. Essensial oil from *Zingiberaceae* for Anti FoodBorne bacteria. *International Food Research Journal* 15:337-346
- Nimah S, WF Ma'ruf, A Trianto. 2012. Uji aktivitas ekstrak teripang pasir (*Holothuria scabra*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus cereus*. *Jurnal Perikanan* 1(2):1-9.
- Ngajow M, Abidjulu J, Kamu VS. 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang mataoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Jurnal Mipa Unsrat online* 2(2):128-132
- Pelczar Jr, M. J dan E. C. S. Chan. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI-Press, Jakarta.
- Permatasari D, Pitopang R, Anam S, Ivan. 2015. Uji daya hambat ekstrak batang tumbuhan *Harrisonia perforata* Merr. terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. *Biocelbes* 9(1): 1-7.
- Pratiwi S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Penerbit Erlangga
- Putri WS, Warditiani NK, Larasanty LPF. 2013. Skrining fitokimia ekstrak etil asetat kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). Bali: Universitas Udayana
- Rachmawati S. 2007. Studi mikroskopi dan skrining fitokimia daun *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis [Skripsi]. Surabaya: Fakultas Farmasi, UNAIR.
- Radji M. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta : EGC.
- Robbins *et al.* 2008. *Buku Saku Dasar Patologis Penyakit*. ECG Jakarta
- Robinson, T., 1991, *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*, ITB, Bandung : 132-6
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Ed ke-5. Padmawinata K, penerjemah; Bandung: ITB. Terjemahan dari: *The Organic Constituents Of Higher Plants*.
- Rochani N. 2009. Uji aktivitas antijamur ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *Candida albicans* serta skrining fitokimianya [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, UMS Surakarta.

- Smith GV. 2006. *Binahong Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis (<http://www.1559.org/database/spelies/ecology.asp?si=776&fr=1&sts=sss>) [11 November 2016]
- Sriyanti DP, Wijayanti A. 2008. *Teknik Kultur Jaringan*. Cetakan ke-9. Yogyakarta : Penerbit Kanisius.
- Thomson RH. 2008. *The Chemistri Of Natural Product. 2 Edition. Chapman and hall ltd.glasgow, UK.*
- Umar A, Krihariyani D, Mutiarawati DT. 2012. Pengaruh pemberian ekstran daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.)Steenis) terhadap kesembuhan luka infeksi *Staphylococcus aureus* pada mencit. *Analisis kesehatan sains* 1: 73.
- Voigt R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi edisi V*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada Pres.
- Wijayakusuma MH. 2000. Potensi tumbuhan obat asli Indonesia sebagai produk kesehatan. *Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiologi*. Pp. 25-6
- Waluyo L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang : UMM press.
- Waji RA, Sugrani A. 2009. “*Flavonoid (Quercetin)*”. Makalah Program S2 Kimia. Makassar: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.
- Yang RY, Lin S, Kuo G. 2008. Content and distrisbution of *Flavonoids* among 91 edible plant spesies. *Asia Pac J Clin Nutr*. 17: 275-279.

L

A

M

P

I

R

A

N

Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman binahong



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
LAB. PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Ir. Sutami 36A Kentingan Surakarta 57126 Telp. (0271) 663375 Fax (0271) 663375
<http://www.biology.mipa.uns.ac.id>, E-mail biologi@mipa.uns.ac.id

Nomor : 016/UN27.9.6.4/Lab/2017
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -

Nama Pemesan : Dwi Yuli Wulandari
NIM : 19134009A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis
Familia : Basellaceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr.(1963) :
1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31b-403b-
404b-405b-414a-415b-451b-466b-467b-468b-469b-470e-541a **49. Basellaceae**
1b **2. Anredera**
1 **Anredera cordifolia (Ten.) Steenis**

Deskripsi Tumbuhan :

Habitus : terna, menahun, merambat, tinggi 1-3 m. Akar : tunggang, bercabang, berdaging lunak, putih kotor atau putih kekuningan atau coklat muda. Batang : bentuk bulat, lunak berair, membelit, kulit batang berwarna merah, permukaan licin dan gundul, panjang bisa mencapai 20-30 m, diameter 3.5 cm. Umbi : muncul di ketiak daun, berbentuk bulat, permukaan kasar, kulit umbi berwarna hijau kecoklatan, daging umbi berwarna putih, panjang 5-7 cm, diameter 1-4 cm. Daun : tunggal, letak berseling, bentuk bulat telur atau jantung, panjang 1-11 cm, lebar 0.75-8 cm, pangkal berlekuk, tepi daun rata, ujung runcing atau tumpul, permukaan licin dan gundul, tulang daun menyirip, permukaan atas hijau tua, permukaan bawah hijau muda; tangkai daun bulat, licin dan gundul, panjang tangkai daun 1-3 cm. Bunga : majemuk tipe tandan yang bercabang atau tidak di ketiak daun, terdiri atas banyak kuntum bunga, bunga kecil-kecil, berbau harum, berkelamin banci (biseksual) atau berkelamin satu (uniseksual), bagian-bagian bunga berbilangan 5; panjang tangkai bunga 1.5-2 mm; brakteola paling bawah bulat telur segitiga, kemerah-merahan; brakteola paling atas putih kehijauan, lebih pendek daripada perhiasan bunga; perhiasan bunga dalam bentuk tepala (tidak bisa dibedakan kelopak bunga dan mahkota bunga), berjumlah 5, bulat telur, diameter 5.5-8 mm, ujungnya tumpul, berlepasan, berwarna krem keputih-putihan; tangkai sari putih, tangkai putik putih.

Surakarta, 4 Januari 2017

Mengetahui
Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS



Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si.
NIP. 19660714 199903 2 001

Penanggungjawab
Determinasi Tumbuhan

Suratmah, S.Si., M.Si.
NIP. 19800705 200212 1 002

Lampiran 2. Tanaman dan serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)



Lampiran 3. Serangkaian proses maserasi



Daun binahong basah



oven



Simplisia daun binahong



Mesin penggiling



Ayakan 40



botol gelap



Penyaringan ekstrak



Rotary evaporator

Lampiran 4. Penetapan kadar lembab serbuk daun binahong dan uji bebas alkohol ekstrak binahong



Penetapan kadar lembab serbuk daun binahong



Uji bebas alkohol ekstrak binahong

Lampiran 5. Alat dan reagen uji identifikasi kandungan senyawa kimia



Lampiran 6. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak

Flavonoid		Saponin	
Alkaloid		Terpenoid	

Lampiran 7. Fraksinasi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air

n-heksana

air



Etil asetat

air

Lampiran 8. Ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air



Ekstrak



n-heksana



Etil asetat



air

Lampiran 9. Alat oven, inkubator dan timbangan



Inkubator



Timbangan

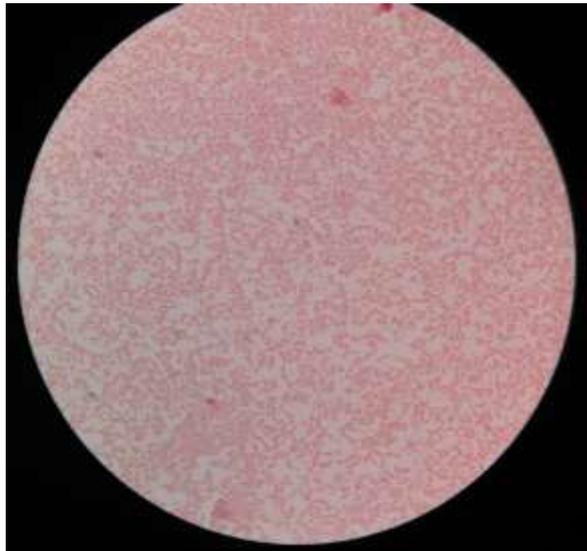


Oven

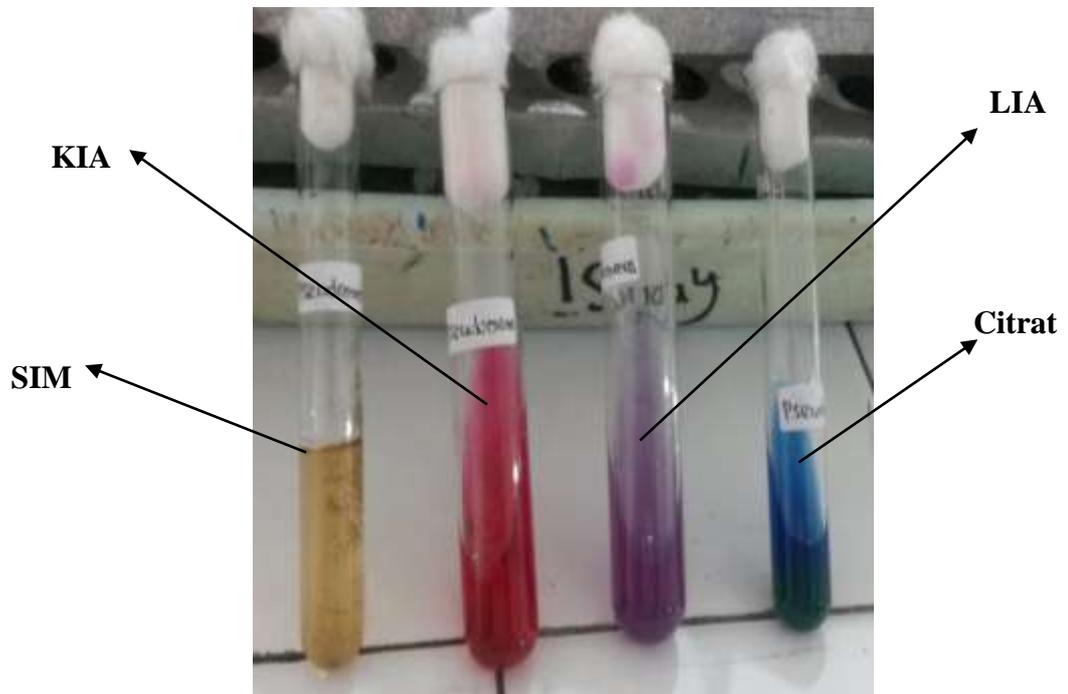
Lampiran 10. Hasil identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Hasil uji makroskopis *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Hasil pewarnaan gram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Hasil uji biokimia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Lampiran 11. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong

No.	Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Persentase (%)
1.	4000	900	22,5

$$\begin{aligned}\text{Perhitungan persentase bobot kering} &= \frac{\text{bobot kering (kg)}}{\text{bobot basah (kg)}} \times 100\% \\ &= \frac{900}{4000} \times 100\% \\ &= 22,5 \%\end{aligned}$$

Lampiran 12. Rendemen ekstrak etanolik daun binahong

Serbuk daun binahong (gram)	Ekstrak kental (gram)	Rendemen(%)
400	80,75	20,18

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{80,75}{400} \times 100\% \\ &= 20,18\%\end{aligned}$$

Lampiran 13. Hasil perhitungan rendemen fraksinasi

Nama Pelarut	Bobot ekstrak (gram)	Bobot Fraksi (gram)	Persen rendemen (%)
<i>n</i> - heksana	30	2,35	7,83
Etil asetat	30	2,63	8,76
Air	30	7,83	26,1

$$\text{Perhitungan rendemen fraksi} = \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

1. Fraksi *n*-heksana

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen fraksi} &= \frac{2,35}{30} \times 100\% \\ &= 7,83\% \end{aligned}$$

2. Fraksi etil asetat

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen fraksi} &= \frac{2,63}{30} \times 100\% \\ &= 8,76\% \end{aligned}$$

3. Fraksi air

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen fraksi} &= \frac{7,83}{30} \times 100\% \\ &= 26,1\% \end{aligned}$$

Lampiran 14. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air metode difusi

1. Konsentrasi 50 %

Menimbang 1 gram ekstrak dilarutkan dengan DMSO 1 % sampai 2 ml

2. Konsentrasi 40 %

$$V \cdot C_{50\%} = V_{1 \text{ mL}} \cdot C_{40\%}$$

$$V \cdot 50\% = 1 \text{ mL} \cdot 40\%$$

$$V \cdot 50\% = 40\%$$

$$V = \frac{40\%}{50\%}$$

$$V = 0,8 \text{ mL}$$

Dipipet 0,8 mL dari sediaan awal (50%) kemudian ditambah DMSO 1% sampai 1 mL

3. Konsentrasi 30%

$$V \cdot C_{40\%} = V_{1 \text{ mL}} \cdot C_{30\%}$$

$$V \cdot 40\% = 1 \text{ mL} \cdot 30\%$$

$$V \cdot 40\% = 30\%$$

$$V = \frac{30\%}{40\%}$$

$$V = 0,75 \text{ mL}$$

Dipipet 0,75 mL dari sediaan awal (40%) kemudian ditambah DMSO 1% sampai 1 mL

Lampiran 15. Pembuatan larutan stok dilusi

Larutan stok 50% = % $\frac{b}{v}$ = 50 gram/100 ml

Konsentrasi 50% = 0,5 gram/ ml

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 25\%} &= V_{0,5} \cdot C_{50\%} &= V_1 \cdot C_2 \\ &0,5 \cdot 50\% &= 1 \cdot C_2 \\ &C_2 &= 25\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 12,5\%} &= V_{0,5} \cdot C_{25\%} &= V_1 \cdot C_2 \\ &0,5 \cdot 25\% &= 1 \cdot C_2 \\ &C_2 &= 12,5\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 6,25\%} &= V_{0,5} \cdot C_{12,5\%} &= V_1 \cdot C_2 \\ &0,5 \cdot 12,5\% &= 1 \cdot C_2 \\ &C_2 &= 6,25\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 3,125\%} &= V_{0,5} \cdot C_{6,25\%} &= V_1 \cdot C_2 \\ &0,5 \cdot 6,25\% &= 1 \cdot C_2 \\ &C_2 &= 3,125\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 1,56\%} &= V_{0,5} \cdot C_{3,125\%} &= V_1 \cdot C_2 \\ &0,5 \cdot 3,125\% &= 1 \cdot C_2 \\ &C_2 &= 1,56\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 0,78\%} &= V_{0,5} \cdot C_{1,56\%} &= V_1 \cdot C_2 \\ &0,5 \cdot 1,56\% &= 1 \cdot C_2 \\ &C_2 &= 0,78\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 0,39\%} &= V_{0,5} \cdot C_{0,78\%} &= V_1 \cdot C_2 \\ &0,5 \cdot 0,78\% &= 1 \cdot C_2 \\ &C_2 &= 0,39\% \end{aligned}$$

$$\text{Konsentrasi } 0,19\% = V_{0,5} \cdot C_{0,39\%} = V_1 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,39\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,19\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,09\% = V_{0,5} \cdot C_{0,19\%} = V_1 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,19\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,09\%$$

Kontrol negatif (-) berisi 1 ml fraksi air

Kontrol positif (+) berisi 1 ml suspensi bakteri

Lampiran 16. Perhitungan pengujian dosis antibiotik gentamisin

Dosis : 40mg/ml

$$\frac{0,04 \text{ gram}}{1 \text{ ml}} \times 100\% = 4 \%$$

Konsentrasi 1 = 4 g/100 ml = 4 %

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 2} &= V_{0,5} \cdot C_{4\%} = V_1 \cdot C_2 \\ 0,5 \cdot 4\% &= 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 2 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 3} &= V_{0,5} \cdot C_{2\%} = V_1 \cdot C_2 \\ 0,5 \cdot 2\% &= 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 1 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 4} &= V_{0,5} \cdot C_{1\%} = V_1 \cdot C_2 \\ 0,5 \cdot 1\% &= 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 0,5 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 5} &= V_{0,5} \cdot C_{0,5\%} = V_1 \cdot C_2 \\ 0,5 \cdot 0,5\% &= 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 0,25 \%$$

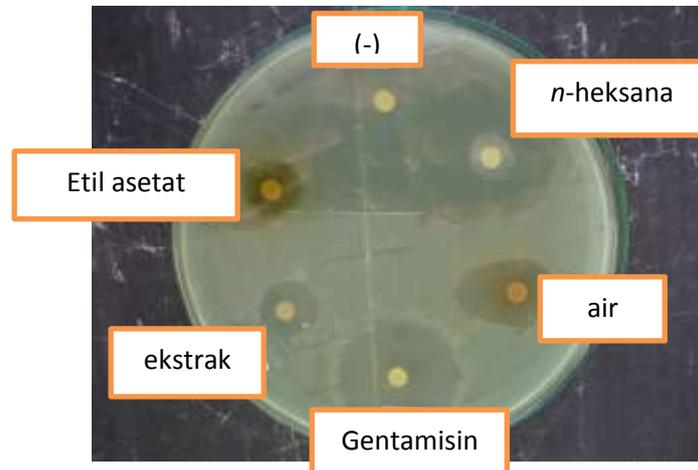
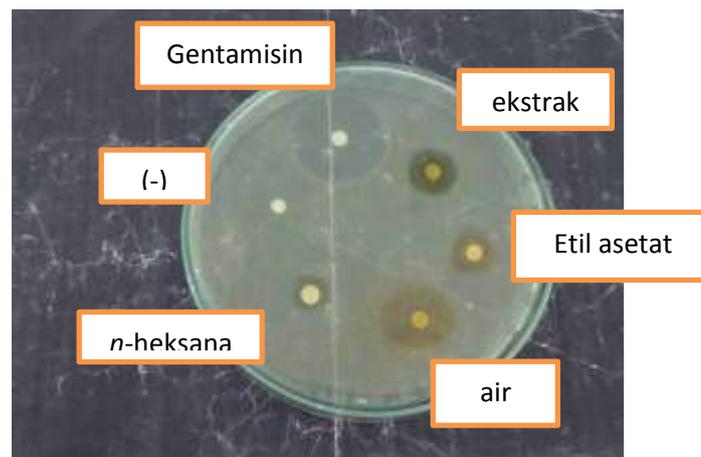
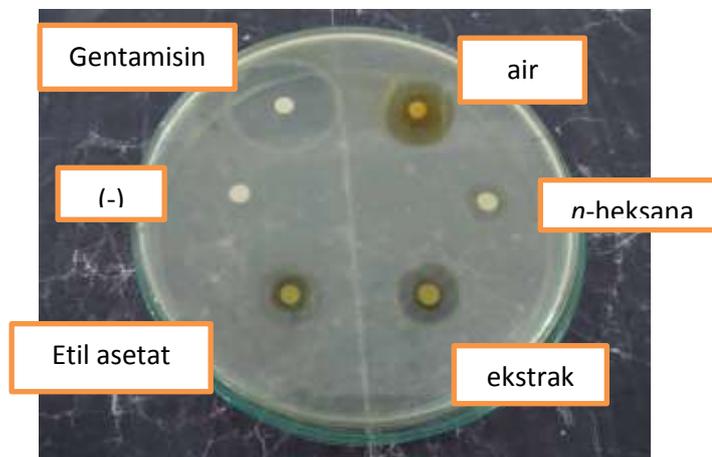
$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 6} &= V_{0,5} \cdot C_{0,25\%} = V_1 \cdot C_2 \\ 0,5 \cdot 0,25\% &= 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 0,125 \%$$

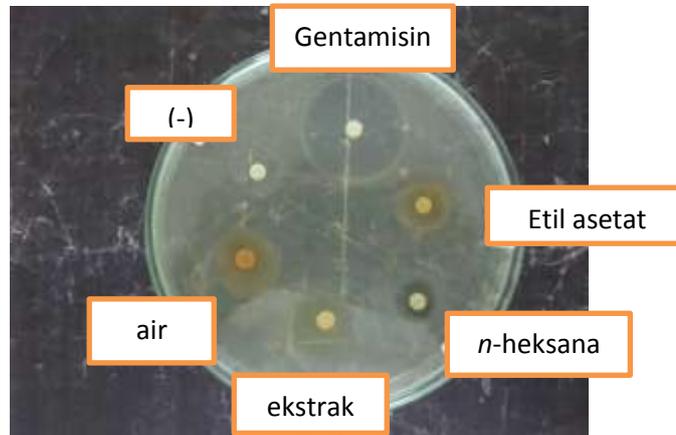
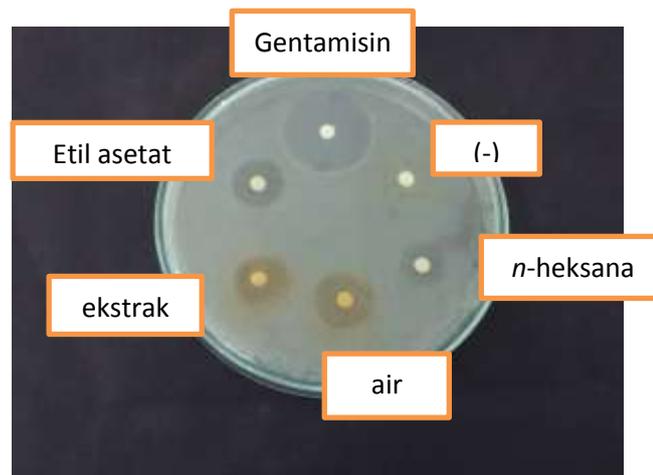
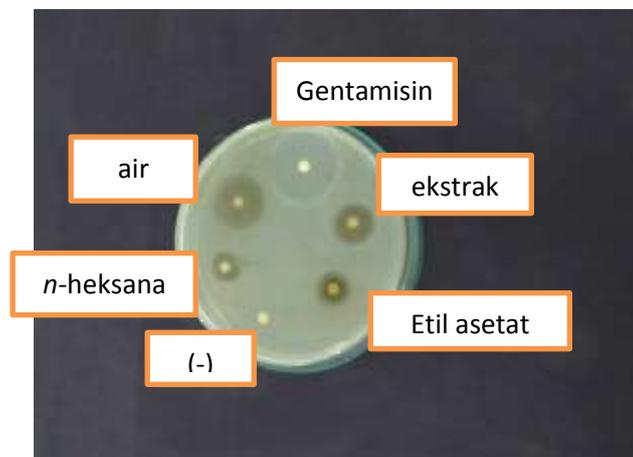
$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 7} &= V_{0,5} \cdot C_{0,125\%} = V_1 \cdot C_2 \\ 0,5 \cdot 0,125\% &= 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 0,0625 \%$$

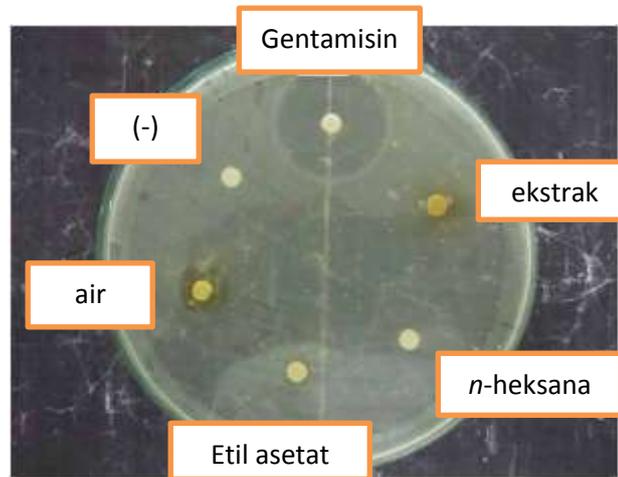
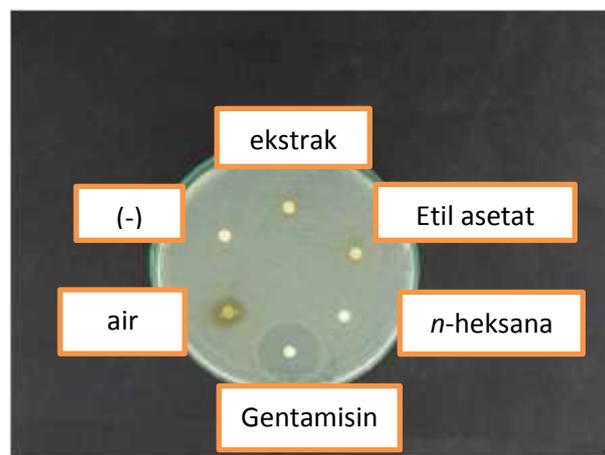
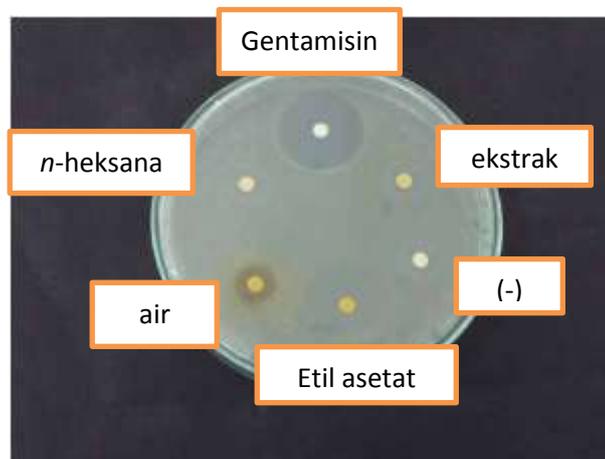
$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi 8} &= V_{0,5} \cdot C_{0,0625\%} &= V_1 \cdot C_2 \\ &0,5 \cdot 0,0625\% &= 1 \cdot C_2 \\ &C_2 &= 0,03125 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi 9} &= V_{0,5} \cdot C_{0,03125\%} &= V_1 \cdot C_2 \\ &0,5 \cdot 0,03125\% &= 1 \cdot C_2 \\ &C_2 &= 0,015625 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi 10} &= V_{0,5} \cdot C_{0,015625\%} &= V_1 \cdot C_2 \\ &0,5 \cdot 0,015625\% &= 1 \cdot C_2 \\ &C_2 &= 0,0078125\%\end{aligned}$$

Lampiran 17. Hasil uji aktivitas antibakteri metode difusi**Uji difusi konsentrasi 50%****Replikasi I****Replikasi II****Replikasi III**

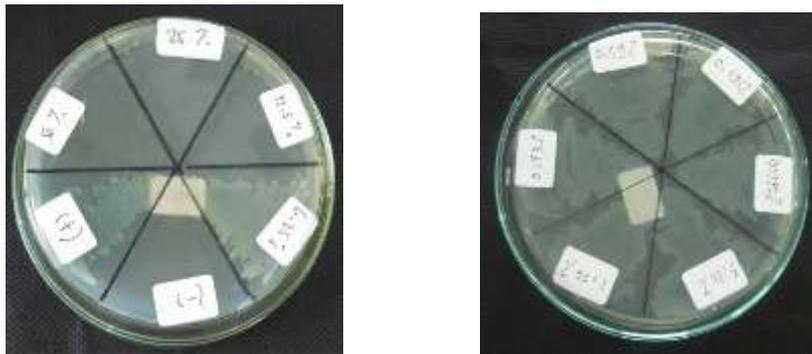
Uji difusi konsentrasi 40%**Replikasi I****Replikasi II****Replikasi III**

Uji difusi konsentrasi 30%**Replikasi I****Replikasi II****Replikasi III**

Lampiran 18. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air metode dilusi



Hasil dilusi fraksi air daun binahong

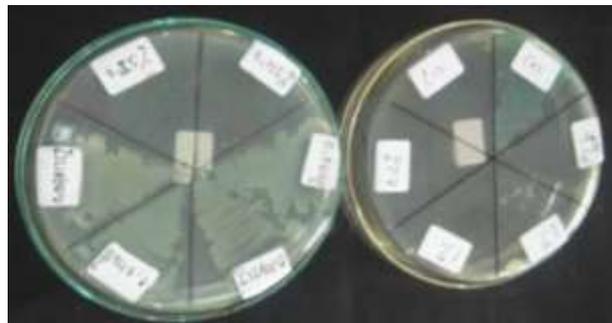


Hasil inokulasi fraksi air daun binahong

Lampiran 19. Hasil uji aktivitas antibakteri gentamisin metode dilusi



Hasil dilusi gentamisin

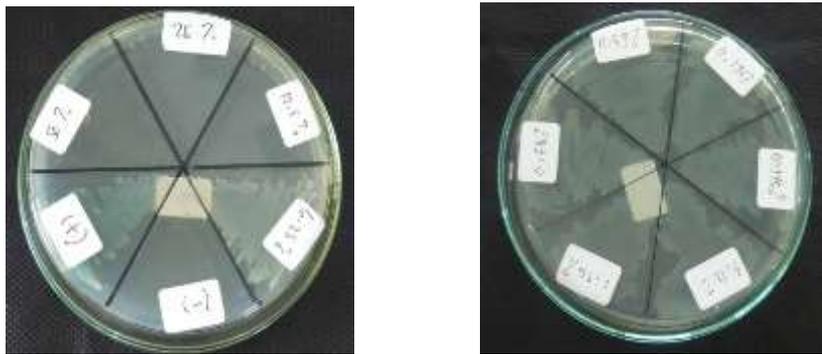


Hasil inokulasi gentamisin

Lampiran 20. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air metode dilusi



Hasil dilusi fraksi air daun binahong

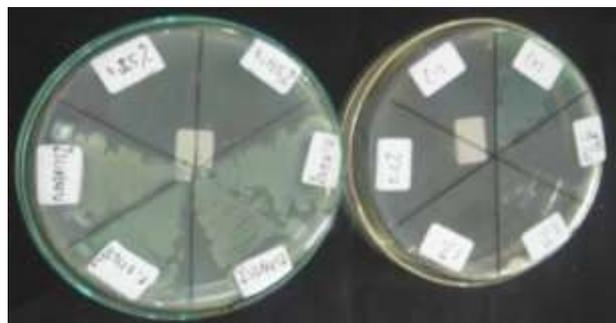


Hasil inokulasi fraksi air daun binahong

Lampiran 21. Hasil uji aktivitas antibakteri gentamisin metode dilusi



Hasil dilusi gentamisin



Hasil inokulasi gentamisin

Lampiran 22. Komposisi media

a. Formulasi dan pembuatan *Brain Heart Infusion* (BHI)

Brain infusion	12,5 gram
Heart infusion	5,0 gram
Proteose peptone	10,0 gram
Glucose	2,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
di-sodium hydrogen phosphate	2,5 gram
Aquadest ad	1000 ml

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam Aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4 (Rhodehamel 1992).

b. Formulasi dan pembuatan *Pseudomonas Selectif Agar* (PSA)

Pepton from Casein	10,0 gram
Pepton from Meat	3,5 gram
Laktosa	10,0 gram
Sodium sulfit	2,5 gram
Fuchsin	0,4 gram
Agar – agar	12,5 gram
pH 7,4	

Reagen – reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1 L, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰ C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri.

c. Sulfida indol motility (SIM)

Pepton from casein	20 g
Pepton from meat	6 g
Ammonium Iron (II) citrate	0,2 g

Sodium thiosulfate	0,2 g
Agar-agar	0,2 g
Aquadest	ad 1000 mL, pH = 7,4

Bahan- bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

d. Klinger Iron Agar (KIA)

Pepton from casein	15 g
Pepton from meat	5 g
Ammonium Iron (II) citrate	0,5 g
Meat extract	3 g
Yeast extract	3 g
Sodium chloride	5 g
Laktosa	10 g
Glukosa	1 g
Sodium thiosulfate	0,5 g
Phenol red	0,024 g
Agar-agar	12 g
Aquadest	ad 1000 ml, pH = 7,4

Bahan- bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

e. Lysine Iron Agar (LIA)

Pepton from casein	5 g
Yeast extract	3 g
Glukosa	1 g
Lysine monohydrochloride	10 g
Sodium thiosulfate	0,04
Ammonium Iron (II) citrate	0,5 g

Bromo cresol purple	0,02 g
Agar-agar	12,5 g
Aquadest	ad 1000 mL, pH = 7,4

Bahan- bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

Lampiran 23. Hasil analisis data uji ANOVA antara fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, ekstrak etanolik dengan konsentrasi 50%, 40%, 30%, kontrol (+), dan kontrol (-).

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
diameter	42	11.026	9.7110	.0	37.0

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter
N		42
Normal Parameters ^{a, b}	Mean	11.026
	Std. Deviation	9.7110
Most Extreme Differences	Absolute	.158
	Positive	.158
	Negative	-.128
Kolmogorov-Smirnov Z		1.021
Asymp. Sig. (2-tailed)		.248

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Diameter

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.720	13	28	.000

ANOVA

Diameter

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3861.861	13	297.066	1816.126	.000
Within Groups	4.580	28	.164		
Total	3866.441	41			

Descriptives

Diameter

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
n-heksana 50%	3	8.267	.2517	.1453	7.642	8.892	8.0	8.5
etil asetat 50%	3	14.100	.1732	.1000	13.670	14.530	14.0	14.3
air 50%	3	18.400	.3606	.2082	17.504	19.296	18.0	18.7
ekstrak 50%	3	16.233	.2517	.1453	15.608	16.858	16.0	16.5
n-heksana 40%	3	7.433	.4041	.2333	6.429	8.437	7.0	7.8
etil asetat 40%	3	12.900	.1732	.1000	12.470	13.330	12.7	13.0
air 40%	3	16.433	.4041	.2333	15.429	17.437	16.0	16.8
ekstrak 40%	3	14.767	.2517	.1453	14.142	15.392	14.5	15.0
n-heksana 30%	3	.000	.0000	.0000	.000	.000	.0	.0
etil asetat 30%	3	.000	.0000	.0000	.000	.000	.0	.0
air 30%	3	9.500	.5000	.2887	8.258	10.742	9.0	10.0
ekstrak 30%	3	.000	.0000	.0000	.000	.000	.0	.0
kontrol positif (gentamisin)	3	36.333	1.1547	.6667	33.465	39.202	35.0	37.0
kontrol negatif (DMSO 1%)	3	.000	.0000	.0000	.000	.000	.0	.0
Total	42	11.026	9.7110	1.4984	8.000	14.052	.0	37.0

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Diameter
Tukey HSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
n-heksana 50%	etil asetat 50%	-5.8333 [†]	.3302	.000	-7.042	-4.625
	air 50%	-10.1333 [†]	.3302	.000	-11.342	-8.925
	ekstrak 50%	-7.9667 [†]	.3302	.000	-9.175	-6.758
	n-heksana 40%	.8333	.3302	.428	-.375	2.042
	etil asetat 40%	-4.6333 [†]	.3302	.000	-5.842	-3.425
	air 40%	-8.1667 [†]	.3302	.000	-9.375	-6.958
	ekstrak 40%	-6.5000 [†]	.3302	.000	-7.709	-5.291
	n-heksana 30%	8.2667 [†]	.3302	.000	7.058	9.475
	etil asetat 30%	8.2667 [†]	.3302	.000	7.058	9.475
	air 30%	-1.2333 [†]	.3302	.042	-2.442	-.025
	ekstrak 30%	8.2667 [†]	.3302	.000	7.058	9.475
	kontrol positif (gentamisin)	-28.0667 [†]	.3302	.000	-29.275	-26.858
	kontrol negatif (DMSO 1%)	8.2667 [†]	.3302	.000	7.058	9.475
etil asetat 50%	n-heksana 50%	5.8333 [†]	.3302	.000	4.625	7.042
	air 50%	-4.3000 [†]	.3302	.000	-5.509	-3.091
	ekstrak 50%	-2.1333 [†]	.3302	.000	-3.342	-.925

	n-heksana 40%	6.6667	.3302	.000	5.458	7.875
	etil asetat 40%	1.2000	.3302	.053	-.009	2.409
	air 40%	-2.3333	.3302	.000	-3.542	-1.125
	ekstrak 40%	-.6667	.3302	.744	-1.875	.542
	n-heksana 30%	14.1000	.3302	.000	12.891	15.309
	etil asetat 30%	14.1000	.3302	.000	12.891	15.309
	air 30%	4.6000	.3302	.000	3.391	5.809
	ekstrak 30%	14.1000	.3302	.000	12.891	15.309
	kontrol positif (gentamisin)	-22.2333	.3302	.000	-23.442	-21.025
	kontrol negatif (DMSO 1%)	14.1000	.3302	.000	12.891	15.309
air 50%	n-heksana 50%	10.1333	.3302	.000	8.925	11.342
	etil asetat 50%	4.3000	.3302	.000	3.091	5.509
	ekstrak 50%	2.1667	.3302	.000	.958	3.375
	n-heksana 40%	10.9667	.3302	.000	9.758	12.175
	etil asetat 40%	5.5000	.3302	.000	4.291	6.709
	air 40%	1.9667	.3302	.000	.758	3.175
	ekstrak 40%	3.6333	.3302	.000	2.425	4.842
	n-heksana 30%	18.4000	.3302	.000	17.191	19.609
	etil asetat 30%	18.4000	.3302	.000	17.191	19.609
	air 30%	8.9000	.3302	.000	7.691	10.109
	ekstrak 30%	18.4000	.3302	.000	17.191	19.609
	kontrol positif (gentamisin)	-17.9333	.3302	.000	-19.142	-16.725
	kontrol negatif (DMSO 1%)	18.4000	.3302	.000	17.191	19.609
ekstrak 50%	n-heksana 50%	7.9667	.3302	.000	6.758	9.175
	etil asetat 50%	2.1333	.3302	.000	.925	3.342
	air 50%	-2.1667	.3302	.000	-3.375	-.958
	n-heksana 40%	8.8000	.3302	.000	7.591	10.009
	etil asetat 40%	3.3333	.3302	.000	2.125	4.542
	air 40%	-.2000	.3302	1.000	-1.409	1.009
	ekstrak 40%	1.4667	.3302	.008	.258	2.675
	n-heksana 30%	16.2333	.3302	.000	15.025	17.442
	etil asetat 30%	16.2333	.3302	.000	15.025	17.442
	air 30%	6.7333	.3302	.000	5.525	7.942
	ekstrak 30%	16.2333	.3302	.000	15.025	17.442
	kontrol positif (gentamisin)	-20.1000	.3302	.000	-21.309	-18.891
	kontrol negatif (DMSO 1%)	16.2333	.3302	.000	15.025	17.442
n-heksana 40%	n-heksana 50%	-.8333	.3302	.428	-2.042	.375
	etil asetat 50%	-6.6667	.3302	.000	-7.875	-5.458
	air 50%	-10.9667	.3302	.000	-12.175	-9.758
	ekstrak 50%	-8.8000	.3302	.000	-10.009	-7.591
	etil asetat 40%	-5.4667	.3302	.000	-6.675	-4.258
	air 40%	-9.0000	.3302	.000	-10.209	-7.791
	ekstrak 40%	-7.3333	.3302	.000	-8.542	-6.125
	n-heksana 30%	7.4333	.3302	.000	6.225	8.642
	etil asetat 30%	7.4333	.3302	.000	6.225	8.642
	air 30%	-2.0667	.3302	.000	-3.275	-.858
	ekstrak 30%	7.4333	.3302	.000	6.225	8.642
	kontrol positif (gentamisin)	-28.9000	.3302	.000	-30.109	-27.691

	kontrol negatif (DMSO 1%)	7.4333	.3302	.000	6.225	8.642
etil asetat 40%	n-heksana 50%	4.6333	.3302	.000	3.425	5.842
	etil asetat 50%	-1.2000	.3302	.053	-2.409	.009
	air 50%	-5.5000	.3302	.000	-6.709	-4.291
	ekstrak 50%	-3.3333	.3302	.000	-4.542	-2.125
	n-heksana 40%	5.4667	.3302	.000	4.258	6.675
	air 40%	-3.5333	.3302	.000	-4.742	-2.325
	ekstrak 40%	-1.8667	.3302	.000	-3.075	-.658
	n-heksana 30%	12.9000	.3302	.000	11.691	14.109
	etil asetat 30%	12.9000	.3302	.000	11.691	14.109
	air 30%	3.4000	.3302	.000	2.191	4.609
	ekstrak 30%	12.9000	.3302	.000	11.691	14.109
	kontrol positif (gentamisin)	-23.4333	.3302	.000	-24.642	-22.225
	kontrol negatif (DMSO 1%)	12.9000	.3302	.000	11.691	14.109
	air 40%	n-heksana 50%	8.1667	.3302	.000	6.958
etil asetat 50%		2.3333	.3302	.000	1.125	3.542
air 50%		-1.9667	.3302	.000	-3.175	-.758
ekstrak 50%		.2000	.3302	1.000	-1.009	1.409
n-heksana 40%		9.0000	.3302	.000	7.791	10.209
etil asetat 40%		3.5333	.3302	.000	2.325	4.742
ekstrak 40%		1.6667	.3302	.002	.458	2.875
n-heksana 30%		16.4333	.3302	.000	15.225	17.642
etil asetat 30%		16.4333	.3302	.000	15.225	17.642
air 30%		6.9333	.3302	.000	5.725	8.142
ekstrak 30%		16.4333	.3302	.000	15.225	17.642
kontrol positif (gentamisin)		-19.9000	.3302	.000	-21.109	-18.691
kontrol negatif (DMSO 1%)		16.4333	.3302	.000	15.225	17.642
ekstrak 40%		n-heksana 50%	6.5000	.3302	.000	5.291
	etil asetat 50%	.6667	.3302	.744	-.542	1.875
	air 50%	-3.6333	.3302	.000	-4.842	-2.425
	ekstrak 50%	-1.4667	.3302	.008	-2.675	-.258
	n-heksana 40%	7.3333	.3302	.000	6.125	8.542
	etil asetat 40%	1.8667	.3302	.000	.658	3.075
	air 40%	-1.6667	.3302	.002	-2.875	-.458
	n-heksana 30%	14.7667	.3302	.000	13.558	15.975
	etil asetat 30%	14.7667	.3302	.000	13.558	15.975
	air 30%	5.2667	.3302	.000	4.058	6.475
	ekstrak 30%	14.7667	.3302	.000	13.558	15.975
	kontrol positif (gentamisin)	-21.5667	.3302	.000	-22.775	-20.358
	kontrol negatif (DMSO 1%)	14.7667	.3302	.000	13.558	15.975
	n-heksana 30%	n-heksana 50%	-8.2667	.3302	.000	-9.475
etil asetat 50%		-14.1000	.3302	.000	-15.309	-12.891
air 50%		-18.4000	.3302	.000	-19.609	-17.191
ekstrak 50%		-16.2333	.3302	.000	-17.442	-15.025
n-heksana 40%		-7.4333	.3302	.000	-8.642	-6.225
etil asetat 40%		-12.9000	.3302	.000	-14.109	-11.691
air 40%		-16.4333	.3302	.000	-17.642	-15.225
ekstrak 40%		-14.7667	.3302	.000	-15.975	-13.558

	etil asetat 30%	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
	air 30%	-9.5000	.3302	.000	-10.709	-8.291
	ekstrak 30%	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
	kontrol positif (gentamisin)	-36.3333	.3302	.000	-37.542	-35.125
	kontrol negatif (DMSO 1%)	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
etil asetat 30%	n-heksana 50%	-8.2667	.3302	.000	-9.475	-7.058
	etil asetat 50%	-14.1000	.3302	.000	-15.309	-12.891
	air 50%	-18.4000	.3302	.000	-19.609	-17.191
	ekstrak 50%	-16.2333	.3302	.000	-17.442	-15.025
	n-heksana 40%	-7.4333	.3302	.000	-8.642	-6.225
	etil asetat 40%	-12.9000	.3302	.000	-14.109	-11.691
	air 40%	-16.4333	.3302	.000	-17.642	-15.225
	ekstrak 40%	-14.7667	.3302	.000	-15.975	-13.558
	n-heksana 30%	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
	air 30%	-9.5000	.3302	.000	-10.709	-8.291
	ekstrak 30%	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
	kontrol positif (gentamisin)	-36.3333	.3302	.000	-37.542	-35.125
	kontrol negatif (DMSO 1%)	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
	air 30%	n-heksana 50%	1.2333	.3302	.042	.025
etil asetat 50%		-4.6000	.3302	.000	-5.809	-3.391
air 50%		-8.9000	.3302	.000	-10.109	-7.691
ekstrak 50%		-6.7333	.3302	.000	-7.942	-5.525
n-heksana 40%		2.0667	.3302	.000	.858	3.275
etil asetat 40%		-3.4000	.3302	.000	-4.609	-2.191
air 40%		-6.9333	.3302	.000	-8.142	-5.725
ekstrak 40%		-5.2667	.3302	.000	-6.475	-4.058
n-heksana 30%		9.5000	.3302	.000	8.291	10.709
etil asetat 30%		9.5000	.3302	.000	8.291	10.709
ekstrak 30%		9.5000	.3302	.000	8.291	10.709
kontrol positif (gentamisin)		-26.8333	.3302	.000	-28.042	-25.625
kontrol negatif (DMSO 1%)		9.5000	.3302	.000	8.291	10.709
ekstrak 30%		n-heksana 50%	-8.2667	.3302	.000	-9.475
	etil asetat 50%	-14.1000	.3302	.000	-15.309	-12.891
	air 50%	-18.4000	.3302	.000	-19.609	-17.191
	ekstrak 50%	-16.2333	.3302	.000	-17.442	-15.025
	n-heksana 40%	-7.4333	.3302	.000	-8.642	-6.225
	etil asetat 40%	-12.9000	.3302	.000	-14.109	-11.691
	air 40%	-16.4333	.3302	.000	-17.642	-15.225
	ekstrak 40%	-14.7667	.3302	.000	-15.975	-13.558
	n-heksana 30%	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
	etil asetat 30%	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
	air 30%	-9.5000	.3302	.000	-10.709	-8.291
	kontrol positif (gentamisin)	-36.3333	.3302	.000	-37.542	-35.125
	kontrol negatif (DMSO 1%)	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
	kontrol positif (gentamisin)	n-heksana 50%	28.0667	.3302	.000	26.858
etil asetat 50%		22.2333	.3302	.000	21.025	23.442
air 50%		17.9333	.3302	.000	16.725	19.142
ekstrak 50%		20.1000	.3302	.000	18.891	21.309

	n-heksana 40%	28.9000 [*]	.3302	.000	27.691	30.109
	etil asetat 40%	23.4333 [*]	.3302	.000	22.225	24.642
	air 40%	19.9000 [*]	.3302	.000	18.691	21.109
	ekstrak 40%	21.5667 [*]	.3302	.000	20.358	22.775
	n-heksana 30%	36.3333 [*]	.3302	.000	35.125	37.542
	etil asetat 30%	36.3333 [*]	.3302	.000	35.125	37.542
	air 30%	26.8333 [*]	.3302	.000	25.625	28.042
	ekstrak 30%	36.3333 [*]	.3302	.000	35.125	37.542
	kontrol negatif (DMSO 1%)	36.3333 [*]	.3302	.000	35.125	37.542
kontrol negatif (DMSO 1%)	n-heksana 50%	-8.2667 [*]	.3302	.000	-9.475	-7.058
	etil asetat 50%	-14.1000 [*]	.3302	.000	-15.309	-12.891
	air 50%	-18.4000 [*]	.3302	.000	-19.609	-17.191
	ekstrak 50%	-16.2333 [*]	.3302	.000	-17.442	-15.025
	n-heksana 40%	-7.4333 [*]	.3302	.000	-8.642	-6.225
	etil asetat 40%	-12.9000 [*]	.3302	.000	-14.109	-11.691
	air 40%	-16.4333 [*]	.3302	.000	-17.642	-15.225
	ekstrak 40%	-14.7667 [*]	.3302	.000	-15.975	-13.558
	n-heksana 30%	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
	etil asetat 30%	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
	air 30%	-9.5000 [*]	.3302	.000	-10.709	-8.291
	ekstrak 30%	.0000	.3302	1.000	-1.209	1.209
	kontrol positif (gentamisin)	-36.3333 [*]	.3302	.000	-37.542	-35.125

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Diameter

Tukey HSD^a

Sampel	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
n-heksana 30%	3	.000							
etil asetat 30%	3	.000							
ekstrak 30%	3	.000							
kontrol negatif (DMSO 1%)	3	.000							
n-heksana 40%	3		7.433						
n-heksana 50%	3		8.267						
air 30%	3			9.500					
etil asetat 40%	3				12.900				
etil asetat 50%	3				14.100	14.100			
ekstrak 40%	3					14.767			
ekstrak 50%	3						16.233		
air 40%	3						16.433		
air 50%	3							18.400	
kontrol positif (gentamisin)	3								36.333
Sig.		1.000	.428	1.000	.053	.744	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.