

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN
AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN KENIKIR
(*Cosmos caudatus* Kunth.) TERHADAP
Salmonella typhi ATCC 13311**



oleh :

**Hanifati Eka Septiani
19133829 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN
AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN KENIKIR
(*Cosmos caudatus* Kunth.) TERHADAP
Salmonella typhi ATCC 13311**



Oleh :

Hanifati Eka Septiani

19133829A

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul :

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN
AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN KENIKIR
(*Cosmos caudatus* Kunth.) TERHADAP
Salmonella typhi ATCC 13311**

Oleh :

Hanifati Eka Septiani
19133829A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 8 Juni 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi

Dekan,



Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt

Pembimbing,

Reslely Harjanti, M.Sc., Apt.
Pembimbing Pendamping,

D. Andang Arif Wibawa, S.P., M.Si.

Penguji :

1. Dr. Ana Indrayati, M.Si.
2. Fransiska Leviana, M.Sc., Apt.
3. Hery Muhamad Ansory, S.Pd., M.Sc.
4. Reslely Harjanti, M.Sc., Apt.

1.

2.

3.

4.

HALAMAN PERSEMBAHAN

Mencari ilmu itu adalah wajib bagi setiap muslim laki-laki maupun muslim perempuan (HR. Ibnu Abdil Barr)

Bukanlah suatu aib jika kamu gagal dalam suatu usaha, yang merupakan aib adalah jika kamu tidak bangkit dari kegagalan itu (Ali bin Abu Thalib)

Bersikaplah kukuh seperti batu karang yang tidak putus-putus-nya dipukul ombak. Ia tidak saja tetap berdiri kukuh, bahkan ia menenteramkan amarah ombak dan gelombang itu (Marcus Aurelius)

Pendidikan merupakan perlengkapan paling baik untuk hari tua (Aristoteles)

Niscaya Allah akan mengangkat (derajat) orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang diberi ilmu beberapa derajat (QS : Al-Mujadilah 11)

Kupersembahkan skripsi ini kepada :

Allah SWT

Keluargaku dan teman-temanku serta

Agama, almamater, bangsa dan negaraku tercinta

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu 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 atau karya ilmiah atau skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, Juni 2017



Hanifati Eka Septiani

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan YME yang telah melimpahkan rahmat dan hidayat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus* Kunth.) TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 13311”

Skripsi ini ditulis untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) pada Fakultas Farmasi di Universitas Setia Budi.

Selama penulisan laporan ini penulis banyak mendapat bantuan, saran dan dorongan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan 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.
3. Reslely Harjanti, M.Sc., Apt., selaku pembimbing utama yang telah berkenan meluangkan banyak waktunya guna memberikan bimbingan, saran, masukan, pengarahan serta motivasi dalam menyusun Skripsi ini.
4. D. Andang Arif Wibawa, S.P., M.Si. selaku pembimbing pendamping yang telah berkenan meluangkan banyak waktunya guna memberikan bimbingan, saran, masukan, pengarahan serta motivasi dalam menyusun Skripsi ini.
5. Dr. Ana Indrayati, M.Si. selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan kritik dan saran sehingga skripsi ini menjadi lebih baik.
6. Fransiska Leviana, M.Sc., Apt. selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan kritik dan saran sehingga skripsi ini menjadi lebih baik.
7. Hery Muhamad Ansory, S.Pd., M.Sc. selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan kritik dan saran sehingga skripsi ini menjadi lebih baik.
8. Staf karyawan laboratorium yang telah meluangkan waktunya untuk mendampingi praktik Skripsi ini dengan sabar sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi ini dengan lancar.

9. Bapak, ibu, adek dan semua keluarga ku yang telah memberikan semangat kepada ku sejak masuk di bangku perkuliahan hingga akhir semester ini.
10. Teman-temanku yang begitu banyak namun namanya tak bisa disebutkan satu persatu yang selalu memberikan semangat, membantu dalam praktikum sehingga dapat menyelesaikan Skripsi dengan lancar dan tepat waktu.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu terima kasih.

Semoga Tuhan memberikan limpahan berkat kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa dalam 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 perbaikan penulisan selanjutnya dimasa yang akan datang. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kefarmasian.

Surakarta, Juni 2017



Hanifati Eka Septiani

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	2
C. Tujuan Penelitian.....	2
D. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Tanaman Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth.)	4
1. Klasifikasi tanaman	4
2. Nama daerah.....	4
3. Deskripsi tanaman	5
4. Khasiat tanaman	5
5. Kandungan kimia	5
5.1. Flavonoid	5
5.2. Saponin	6
5.3. Alkaloid.....	6
5.4. Tanin	6
B. Simplisia	6
1. Pengertian simplisia	6
2. Pencucian dan pengeringan	7
C. Metode Penyarian	7

1.	Ekstraksi	7
2.	Maserasi.....	8
3.	Fraksinasi.....	8
4.	Cairan penyari untuk ekstraksi	8
4.1.	Etanol 70%.....	9
4.2.	<i>n</i> -heksana	9
4.3.	Etil asetat.....	9
4.4.	Air	10
D.	Tinjauan <i>Salmonella typhi</i>	10
1.	Sistematika	10
2.	Morfologi.....	10
3.	Patogenitas dan gejala klinik.....	10
E.	Antibakteri.....	11
1.	Definisi antibakteri	11
2.	Mekanisme kerja zat antibakteri.....	12
2.1.	Menghambat sintesis dinding sel bakteri.....	12
2.2.	Mengganggu permeabilitas membran sel bakteri	12
2.3.	Mengganggu metabolisme mikroba.....	13
2.4.	Menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri	13
2.5.	Menghambat sintesis protein sel bakteri.....	13
3.	Metode uji antibakteri	13
3.1.	Metode difusi	13
3.2.	Metode dilusi	14
4.	Media uji.....	14
5.	Sterilisasi	15
F.	Kloramfenikol.....	15
G.	Landasan Teori	16
H.	Hipotesis	17
BAB III	METODE PENELITIAN	18
A.	Populasi dan Sampel.....	18
1.	Populasi	18
2.	Sampel	18
B.	Variabel Penelitian	18
1.	Identifikasi variabel utama	18
2.	Klasifikasi variabel utama	18
3.	Definisi operasional variabel utama	19
C.	Alat dan Bahan	20
1.	Alat	20
1.1.	Alat untuk pembuatan dan analisis serbuk simplisia	20
1.2.	Alat maserasi.....	20
1.3.	Alat uji aktivitas antibakteri.....	20
1.4.	Alat identifikasi kandungan senyawa.	20
2.	Bahan.....	20
2.1.	Bahan utama.....	20

2.2.	Bahan kimia	20
2.3.	Bakteri uji.....	21
2.4.	Media	21
D.	Jalan Penelitian.....	21
1.	Determinasi tanaman.....	21
2.	Pembuatan serbuk simplisia	21
3.	Kadar air serbuk daun kenikir	21
4.	Pembuatan ekstrak daun kenikir.....	22
5.	Uji bebas etanol	22
6.	Fraksinasi.....	22
7.	Pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun kenikir.....	23
7.1.	Identifikasi flavonoid.....	23
7.2.	Identifikasi saponin.....	23
7.3.	Identifikasi alkaloid	23
7.4.	Identifikasi tanin	24
8.	Sterilisasi	24
9.	Identifikasi bakteri uji	24
9.1.	Identifikasi secara goresan.....	24
9.2.	Identifikasi secara pewarnaan Gram.....	24
9.3.	Identifikasi secara biokimia	24
10.	Pembuatan suspensi bakteri uji	25
11.	Pengujian daya antibakteri dengan metode difusi	26
12.	Pengujian daya antibakteri dengan metode dilusi	26
E.	Analisis Hasil.....	27
 BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....		32
1.	Determinasi tanaman kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth.).....	32
2.	Pembuatan serbuk daun kenikir	32
3.	Penetapan kadar air serbuk daun kenikir.....	33
4.	Pembuatan ekstrak etanol daun kenikir.....	33
5.	Uji bebas etanol ekstrak daun kenikir	34
6.	Fraksinasi daun kenikir	34
7.	Pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun kenikir.....	35
8.	Identifikasi bakteri uji <i>S. typhi</i> ATCC 13311	36
8.1.	Identifikasi secara goresan.....	36
8.2.	Identifikasi secara pewarnaan	37
8.3.	Identifikasi secara biokimia	38
9.	Pengujian daya antibakteri dengan metode difusi	39
10.	Pengujian daya antibakteri fraksi teraktif dengan metode dilusi	42
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		45
A.	Kesimpulan.....	45
B.	Saran	45

DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	49

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1.	<i>Cosmos caudatus</i> Kunth. (Dokumen pribadi)	4
Gambar 2.	Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth.)	28
Gambar 3.	Skema pembuatan suspensi bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311	29
Gambar 4.	Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun kenikir terhadap <i>S. typhi</i> ATCC 13311 dengan metode difusi.....	30
Gambar 5.	Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun kenikir terhadap <i>S. typhi</i> ATCC 13311 dengan metode dilusi.	31
Gambar 6.	Foto identifikasi secara goresan <i>S. typhi</i> ATCC 13311.....	37
Gambar 7.	Foto identifikasi secara pewarnaan Gram negatif <i>S. typhi</i> ATCC 13311	37
Gambar 8.	Foto identifikasi uji biokimia <i>S. typhi</i> ATCC 13311.....	39

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah daun kenikir.....	32
Tabel 2. Hasil penetapan kadar air serbuk daun kenikir.....	33
Tabel 3. Hasil persen rendemen ekstrak etanol daun kenikir	34
Tabel 4. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun kenikir	34
Tabel 5. Hasil persen rendemen fraksinasi daun kenikir	35
Tabel 6. Hasil pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun kenikir	36
Tabel 7. Hasil identifikasi uji biokimia pada <i>S. typhi</i> ATCC 13311	38
Tabel 8. Hasil diameter hambat uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun kenikir metode difusi	40
Tabel 9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun kenikir dan pembandingan antibiotik kloramfenikol metode dilusi.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat keterangan hasil determinasi tanaman kenikir	50
Lampiran 2. Gambar daun kenikir dan serbuk daun kenikir.....	51
Lampiran 3. Gambar alat <i>Sterling-bidwell</i> , vortex, inkubator, autoclav, evaporator, uji bebas etanol	52
Lampiran 4. Gambar ekstrak etanol, proses dan hasil fraksinasi daun kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth.)	53
Lampiran 5. Gambar pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun kenikir	54
Lampiran 6. Gambar uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun kenikir terhadap <i>S. typhi</i> ATCC 13311 metode difusi	55
Lampiran 7. Gambar uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun kenikir terhadap <i>S. typhi</i> ATCC 13311 metode dilusi	58
Lampiran 8. Gambar uji aktivitas antibakteri antibiotik kloramfenikol terhadap <i>S. typhi</i> ATCC 13311 metode dilusi.....	58
Lampiran 9. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun kenikir.....	60
Lampiran 10. Perhitungan persentase penetapan kadar air serbuk daun kenikir .	61
Lampiran 11. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol daun kenikir...	62
Lampiran 12. Perhitungan persen rendemen fraksinasi daun kenikir.....	63
Lampiran 13. Perhitungan dan pembuatan konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi daun kenikir metode difusi	64
Lampiran 14. Perhitungan dan pembuatan konsentrasi fraksi teraktif (fraksi etil asetat) daun kenikir metode dilusi	65
Lampiran 15. Perhitungan dan pembuatan konsentrasi antibiotik kloramfenikol metode dilusi	67

Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media.....	69
Lampiran 17. Analisa data uji ANOVA antara ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air dengan konsentrasi 50%; 25% dan 12,5% serta kontrol (+) dan kontrol (-) terhadap <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311	72

INTISARI

SEPTIANI, H.E., 2017, AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus* Kunth.) TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 13311. SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Tanaman kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) merupakan tanaman yang sudah sejak lama digunakan dalam pengobatan tradisional. Daun kenikir mengandung flavonoid, saponin, alkaloid dan tanin. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun kenikir terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Serbuk daun kenikir diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, kemudian difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Hasil ekstraksi dan fraksinasi dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dilakukan untuk mengetahui daya hambat dan fraksi teraktif terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 dengan konsentrasi 50%; 25% dan 12,5%. Metode dilusi dilakukan untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum dari fraksi teraktif dengan seri pengenceran konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,563%; 0,781%; 0,391%; 0,196% and 0,098%. Analisis statistik menggunakan ANOVA *oneway* guna mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antar sediaan uji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua fraksi dan ekstrak mempunyai aktivitas antibakteri. Fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dengan diameter hambat 24,00 mm pada konsentrasi 50%; 24,67 mm konsentrasi 25% dan 20,00 mm konsentrasi 12,5%. Hasil uji dilusi fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas antibakteri dengan KBM 6,25%.

Kata kunci : *Cosmos caudatus* Kunth., *Salmonella typhi* ATCC 13311, antibakteri, fraksi.

ABSTRACT

SEPTIANI, H.E., 2017, ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF FRACTION *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE AND WATER OF ETHANOL EXTRACT FROM KENIKIR (*Cosmos caudatus* Kunth.) LEAVES TO *Salmonella typhi* ATCC 13311. THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Kenikir plant (*Cosmos caudatus* Kunth.) has long been known as the traditional medicine. Kenikir leaves contains flavonoid, saponin, alkaloid, and tannin. This research is conducted to determine the antibacterial activity of the fraction of *n*-hexane, ethyl acetate and water from kenikir leaves ethanol extract to *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Kenikir leaves powder is extracted using maceration method with 70% ethanol solvent then fractioned using *n*-hexane solvent, ethyl acetate and water. The result of the extraction and fraction is then used in antibacterial activity test of *Salmonella typhi* ATCC 13311 using diffusion and dilution method. Diffusion method is accomplished to know the resistivity and the most active fraction to *Salmonella typhi* ATCC 13311 using the concentration of 50%; 25% and 12,5%. Dilution method is conducted to know the minimum concentration of killing ability from the most active fraction using the serial concentration of 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,563%; 0,781%; 0,391%; 0, 196% and 0,098%. ANOVA *oneway* is used in statistic analysis to determine whether there is a significant difference between the test preparation or not.

The result of the analysis shows that all the fractions and extract have antibacterial activity. Ethyl acetate fraction is the most active fraction with 24,00 mm of resistivity diameter in the concentration of 50%; 24,67 mm in the concentration of 25% and 20,00 mm in the concentration of 12,5%. The dilution test result of ethyl acetate shows antibacterial activity with MBC of 6,25%.

Keyword : *Cosmos caudatus* Kunth., *Salmonella typhi* ATCC 13311, antibacterial, fraction.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Demam tifoid adalah demam yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif *S. typhi* yang hanya ditemukan pada manusia. Gejala yang ditimbulkan seperti demam, sakit perut, leukositosis, sembelit, pembesaran limfa dan diare. Penderita dapat kehilangan nafsu makan, ruam pada wajah dan bintik-bintik merah (Radji & Biomed 2010). Menurut WHO (2013) angka insidensi di seluruh dunia terdapat sekitar 17 juta per tahun dengan 600.000 orang meninggal karena demam tifoid dan 70% kematiannya terjadi di Asia.

Demam tifoid biasanya diobati dengan antibiotik. Kloramfenikol merupakan antibiotik klinik pertama yang digunakan selama puluhan tahun. Adanya efek samping yang ditimbulkan setelah penggunaan antibiotika maka mendorong dilakukannya penelitian untuk mencari alternatif lain yang lebih aman, misalnya penggunaan tanaman obat tradisional yang memiliki potensi sebagai antibakteri (Saepudin *et al.* 2007).

Salah satu tanaman obat tradisional yang digunakan oleh masyarakat sebagai pengobatan adalah daun kenikir. Daun kenikir berkhasiat sebagai obat penambah nafsu makan, lemah lambung, penguat tulang, pengobatan infeksi kuman penyebab penyakit dan pengusir serangga (Hariana 2013). Daun kenikir memiliki kandungan diantaranya flavonoid, saponin, alkaloid dan tanin (Rasdi *et al.* 2010).

Metode penyarian daun kenikir yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut etanol 70% dan difraksinasi dengan *n*-heksana, etil asetat dan air. Penggunaan pelarut yang berbeda polaritasnya disebabkan kandungan senyawa kimia yang terdapat pada daun kenikir mempunyai polaritas yang berbeda-beda sehingga dilakukan fraksinasi.

Penelitian Putri (2010) menyatakan bahwa ekstrak metanol daun kenikir mempunyai aktivitas sebagai antibakteri terhadap *S. typhi*. Variasi konsentrasi yang digunakan adalah 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml dan 30 mg/ml.

Konsentrasi 30 mg/ml merupakan konsentrasi yang paling efektif sebagai antibakteri terhadap *S. typhi* dengan zona hambat sebesar 24,2 mm.

Metode yang digunakan untuk menguji *S. typhi* adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi menggunakan cakram (disc) dengan konsentrasi tertentu dengan cara menempelkan cakram pada permukaan medium padat sesudah diolesi bakteri uji lalu diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37⁰C. Metode dilusi yaitu menggunakan tabung dengan seri konsentrasi menurun secara bertahap dengan media cair, kemudian larutan uji diinokulasikan pada media padat lalu diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37⁰C (Jawetz *et al.* 2001).

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, permasalahan pada penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut :

Pertama, apakah fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun kenikir mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* ATCC 13311?

Kedua, manakah antara fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun kenikir yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dalam menghambat *S. typhi* ATCC 13311?

Ketiga, berapakah diameter hambat yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dalam menghambat *S. typhi* ATCC 13311?

Keempat, berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dalam menghambat *S. typhi* ATCC 13311 ?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

Pertama, untuk mengetahui dan membuktikan aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun kenikir terhadap *S. typhi* ATCC 13311.

Kedua, untuk mengetahui aktivitas antibakteri paling efektif dalam menghambat *S. typhi* ATCC 13311 antara fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun kenikir.

Ketiga, untuk mengetahui diameter hambat yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dalam menghambat *S. typhi* ATCC 13311.

Keempat, untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dalam menghambat *S. typhi* ATCC 13311.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan tambahan pengetahuan khususnya tentang obat tradisional yang dapat digunakan sebagai masukan bagi masyarakat dalam upaya pemanfaatan daun kenikir untuk mengatasi masalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S. typhi* sehingga peranannya sebagai tanaman obat lebih berarti.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.)

1. Klasifikasi tanaman

Klasifikasi secara lengkap tanaman kenikir sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Sub Class	: Asteridae
Ordo	: Asterales
Famili	: Asteraceae
Genus	: Cosmos
Spesies	: <i>Cosmos caudatus</i> Kunth. (Judd <i>et al.</i> 1999 ; Simpson 2006)



Gambar 1. *Cosmos caudatus* Kunth. (Dokumen pribadi)

2. Nama daerah

Tanaman daun kenikir memiliki beberapa nama daerah yaitu Ulam raja (Melayu), Kenikir (Jawa Tengah), Kembang tahi ayam (Bangka), Cosmos (Inggris), Turay-turay (Filipina), Estrella de Mar (Spanyol), Khamhae (Thailand) (Hariana 2008 ; Kays 2011).

3. Deskripsi tanaman

Tumbuhan ini termasuk tumbuhan herbal semusim dengan tinggi antara 0,5-1,5 meter. Batang tegak, beralur, dan mempunyai banyak percabangan serta berwarna hijau terang keunguan. Daunnya lembut dan tajam. Ketika malam hari, biasanya daun melipat untuk menutup kuncup terminal. Daun majemuk berbentuk lanset dengan ujung yang meruncing dan berwarna hijau dengan tepi daun bergerigi. Bunga dari tumbuhan ini ditemukan soliter atau berkumpul dalam kelompok (majemuk) pada satu tangkai. Bunga majemuk mempunyai tangkai bunga berbentuk seperti cawan berwarna kuning. Setiap di bagian bawah bunga terdapat daun pembalut berwarna hijau berbentuk seperti lonceng. Buahnya keras, berbentuk jarum dan ujungnya berambut. Biji keras, kecil, berbentuk jarum dengan panjang ± 1 cm serta berwarna hitam (Hassan 2006).

4. Khasiat tanaman

Daun kenikir banyak dikonsumsi masyarakat sebagai sayuran. Secara tradisional daun ini juga digunakan sebagai obat penambah nafsu makan, lemah lambung, penguat tulang, pengobatan infeksi kuman penyebab penyakit dan pengusir serangga (Hariana 2013).

5. Kandungan kimia

Tanaman kenikir mengandung flavonoid, saponin, alkaloid dan tanin (Rasdi dkk 2010). Kandungan flavonoid dalam 100 mg daun kenikir menurut Batari (2007) sebesar 52,18 mg. Sedangkan kadar saponin menurut Balitnak Ciawi sebesar 2,2% berat kering.

Kandungan antibakteri yang dimiliki oleh daun kenikir adalah flavonoid, saponin, alkaloid dan tanin :

5.1. Flavonoid. Flavonoid merupakan golongan polifenol sehingga memiliki sifat kimia fenol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Flavonoid juga memiliki sejumlah gugus hidroksil sehingga pada umumnya larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, air dan sebagainya. Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Dewanti & Wahyudi 2011).

5.2. Saponin. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika dikocok dalam air. Saponin merupakan senyawa antibakteri karena memiliki kemampuan dalam menghambat fungsi membran sel sehingga merusak permeabilitas membran yang mengakibatkan dinding sel rusak atau hancur (Chapagain & Wiesman 2005).

5.3. Alkaloid. Alkaloid didapat dari sebagian besar tanaman berbunga (magnoliopsida). Alkaloid merupakan salah satu komponen aktif lain dalam daun kenikir yang mempunyai sifat antimikroba yang mempengaruhi aktivitas fisiologi. Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Juliantina *et al.* 2008).

5.4. Tanin. Tanin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dan disintesis oleh tanaman. Tanin larut dalam pelarut organik polar namun tidak larut dalam pelarut organik non polar (Jayanegara *et al.* 2008). Tanin terletak di dalam tumbuhan terpisah dari protein dan enzim sitoplasma, tetapi bila jaringan rusak dapat terjadi reaksi penyamakan. Tanin merupakan senyawa fenol berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri dengan memunculkan denaturasi protein dan menurunkan tegangan permukaan (Sudirman 2014).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alami yang digunakan untuk obat dan belum mengalami perubahan proses apapun dan kecuali dinyatakan lain umumnya berupa bahan yang telah dikeringkan. Berdasarkan hal itu maka simplisia dibagi menjadi tiga golongan, yaitu simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan atau mineral (Gunawan & Mulyani 2004).

Simplisia nabati adalah simplisia yang dapat berupa tanaman utuh, bagian tanaman, eksudat tanaman atau gabungan antara ketiganya. Eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau dengan cara tertentu

sengaja dikeluarkan dari selnya. Simplisia hewani adalah berupa hewan utuh atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa bahan kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa bahan kimia murni (Gunawan & Mulyani 2004).

2. Pencucian dan pengeringan

Pencucian dilakukan untuk memisahkan kotoran atau bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih. Bahan simplisia yang mengandung zat yang mudah larut dalam air, pencucian agar dilakukan dalam waktu yang secepat mungkin (Prastowo 2013).

Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Penurunan mutu atau kerusakan simplisia dapat dicegah dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatis. Reaksi enzimatis tidak akan berlangsung bila kadar air dalam simplisia kurang dari 10%. Proses pengeringan sudah dapat menghentikan proses enzimatis dalam sel bila kadar airnya dapat mencapai kurang dari 10% (Prastowo 2013).

C. Metode Penyarian

1. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes 2000).

Ekstrak tumbuhan obat yang dibuat dari simplisia nabati dapat dipandang sebagai bahan awal, bahan antara atau bahan produk jadi. Ekstrak sebagai bahan awal dianalogkan dengan komoditi bahan baku obat yang dengan teknologi fitofarmasi diproses menjadi produk jadi. Ekstrak sebagai bahan antara berarti masih menjadi bahan yang dapat diproses lagi menjadi fraksi-fraksi, isolat senyawa tunggal atau sebagai campuran dengan ekstrak lain. Ekstrak sebagai

produk jadi berarti ekstrak yang berada dalam sediaan obat jadi siap digunakan oleh penderita (Depkes 2000).

2. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Prinsip metode ini adalah pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinue (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyarian maserat pertama dan seterusnya (Depkes 2000).

Maserasi dapat dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok, dimasukkan dalam bejana lalu dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk, sari kemudian diencerkan dan ampas diperas. Ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Keuntungan metode maserasi adalah alat yang digunakan sederhana, murah dan mudah dilakukan (Depkes 2000).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan kandungan golongan utama yang satu dengan golongan utama yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Pemisahan jumlah dan jenisnya menjadi fraksi yang berbeda, mula-mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari pelarut semi polar dan yang terakhir disari dengan pelarut polar (Harbone 2006).

4. Cairan penyari untuk ekstraksi

Pemilihan larutan penyari juga harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara kimia dan fisika, bereaksi netral, selektif yaitu menarik zat berkhasiat yang dikehendaki dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat.

Cairan penyari atau pelarut ada tiga macam yaitu pelarut non polar, semi polar dan polar, contohnya cairan penyari etanol, *n*-heksana, etil asetat dan air.

4.1. Etanol 70%. Etanol merupakan senyawa organik dengan rumus kimia C_2H_5OH atau disebut juga etil alkohol yang di pasaran lebih dikenal sebagai alkohol. Etanol 70% merupakan larutan serba guna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan agar diperoleh hasil yang baik, penyarian biasanya digunakan campuran antara etanol dan air. Etanol 70% dipertimbangkan sebagai penyari karena lebih efektif dalam menghasilkan jumlah bahan yang optimal dan bahan yang diperlukan hanya sedikit yang turut ke dalam pengestraksi. Keuntungan etanol 70% antara lain tidak beracun, absorbsinya baik, sulit ditumbuhi mikroorganisme, efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal dimana bahan pengotor hanya dalam skala kecil ikut dalam cairan pengestraksi, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan dan dapat melarutkan alkaloid, minyak menguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakinon, flavonoid, steroid, damar, klorofil, tanin dan saponin (List 2000).

4.2. *n*-heksana. *n*-heksana merupakan sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} . Awalan heks- merujuk pada enam karbon atom yang terdapat pada heksana dan akhiran -ana berasal dari alkana, yang merujuk pada ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. Senyawa ini merupakan pelarut non polar berupa cairan yang jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar dan mempunyai bau seperti eter lemah atau bau seperti petrolium, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa non polar antara lain minyak atsiri, terpenoid, triterpenoid, sterol, asam lemak, alkaloid, karotenoid, klorofil dan resin (Depkes 2005).

4.3. Etil asetat. Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus $CH_3CH_2OC(O)CH_3$ yang sering disingkat EtOAc, dengan Et mewakili gugus etil dan OAc mewakili asetat. Etil asetat merupakan pelarut semi polar, mudah terbakar dan menguap, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas, cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah, larut dalam 15 bagian air, dapat bercampur dalam eter, etanol dan kloroform. Senyawa

yang larut dalam pelarut ini adalah flavonoid, saponin, alkaloid dan polifenol (Harbone 2006).

4.4. Air. Air adalah pelarut yang sangat polar dengan rumus kimia H₂O. Air cocok digunakan untuk menyari senyawa-senyawa organik polar dalam proses fraksinasi. Pelarut air dipilih karena air dapat melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tanin, saponin, gom, protein, enzim, lilin, pektin dan zat warna asam organik (Depkes 2005).

D. Tinjauan *Salmonella typhi*

1. Sistematika

Sistematika secara lengkap bakteri *Salmonella typhi* sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Ordo	: Gamma Proteobacteria
Class	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: Salmonella
Spesies	: <i>Salmonella typhi</i> (Jawetz <i>et al.</i> 2005).

2. Morfologi

S. typhi merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang bergerak yang khas memfermentasi glukosa dan manosa tanpa membentuk gas tetapi tidak memfermentasi laktosa dan sukrosa. *S. typhi* menghasilkan H₂S (Jawetz *et al.* 2005). Isolat Salmonella pada media SSA pada suhu 37°C maka koloni akan tampak cembung, transparan, bercak hitam di bagian pusat (Nugraha 2012). Bakteri Salmonella akan mati pada suhu 60°C selama 15-20 menit melalui pasteurisasi, pendidihan dan khlorinasi (Depkes 2006).

3. Patogenitas dan gejala klinik

S. typhi menyebabkan infeksi pada manusia. Bakteri ini bersifat patogen yang hidup dan berkembang biak pada manusia dan hewan. *S. typhi* masuk melalui mulut bersama makanan dan minuman yang terkontaminasi. Dosis infeksi penyebab penyakit pada manusia dalam menimbulkan infeksi klinik sekitar 103-

108 sel/mL. Faktor inang juga mempengaruhi jumlah bakteri di dalam tubuh, diantaranya keasaman lambung, flora normal usus dan daya tahan usus setempat. Infeksi yang terjadi pada manusia akibat *S. typhi* adalah demam enterik (Demam Tifoid), bakterimia dan enterokolitis (Jawetz *et al.* 2005).

S. typhi menghasilkan endotoksin yang merupakan kompleks lipopolisakarida. Kompleks ini dianggap berperan penting pada patogenesis demam tifoid. Endotoksin bersifat pirogenik serta meningkatkan reaksi peradangan di tempat bakteri Salmonella berkembang biak. Infeksi terjadi melalui lambung dan mencapai usus dan invasi ke jaringan limfosit yang merupakan tempat untuk berkembang biak. Mesentrik bakteri melalui saluran limfe masuk aliran darah sistemik (bakterimia) pada fase ini disebut sebagai fase inkubasi terjadi pada 7-14 hari. Setelah itu terjadi hiperplasia kemudian nekrosis dan selanjutnya ulserasi hingga membentuk ulkus. Infeksi terjadi pada organ yang lain diantaranya tulang, usus, paru, ginjal, jantung, empedu dan organ lain. Bakteri dapat tinggal dalam empedu sehingga bersifat sebagai penderita karier akibat penyembuhan tidak sempurna (Depkes 2006).

E. Antibakteri

1. Definisi antibakteri

Antibakteri adalah obat atau senyawa kimia yang digunakan untuk membasmi bakteri, khususnya bakteri yang bersifat merugikan manusia. Beberapa istilah yang digunakan untuk menjelaskan proses pembunuhan bakteri yaitu bakterisida, bakteriostatik, germisid, antiseptik dan desinfektan. Zat antibakteri dapat bersifat bakterisida (membunuh bakteri), bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri), germisid (menghambat germinasi spora bakteri), antiseptik (membunuh atau menghambat bakteri pada jaringan hidup) dan desinfektan (membunuh atau menghambat bakteri pada jaringan mati). Kemampuan suatu zat antimikroba dalam menghambat pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya : 1) konsentrasi zat antimikroba, 2) jenis, jumlah, umur dan keadaan mikroba, 3) suhu, 4) waktu dan 5) sifat kimia dan fisik makanan termasuk kadar air, pH, jenis dan jumlah komponen didalamnya (Agustrina 2011).

Ruang lingkup bakteri yang dapat dipengaruhi oleh zat antibakteri disebut dengan spektrum antibakteri. Berdasarkan spektrum aksinya, zat antibakteri dibagi menjadi 3, yaitu : 1) Spektrum luas adalah zat antibakteri yang efektif melawan prokariot, baik membunuh atau menghambat bakteri Gram positif dan negatif dalam ruang lingkup yang luas, 2) Spektrum sempit adalah zat antibakteri yang efektif melawan sebagian bakteri Gram positif atau negatif, 3) Spektrum terbatas adalah zat antibakteri yang efektif melawan suatu spesies bakteri tertentu (Agustrina 2011).

2. Mekanisme kerja zat antibakteri

Penjelasan Jawetz *et al.* (2005) tentang mekanisme kerja dari senyawa antibakteri diantaranya yaitu menghambat sintesis dinding sel bakteri, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, mengganggu metabolisme mikroba, menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri dan menghambat sintesis protein sel bakteri.

2.1. Menghambat sintesis dinding sel bakteri. Pada umumnya dinding sel bakteri terdiri atas polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat rusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubah setelah terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis.

2.2. Mengganggu permeabilitas membran sel bakteri. Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh selaput yang disebut membran sel yang mempunyai permeabilitas selektif, membran ini tersusun atas fosfolipid dan protein. Membran sel berfungsi untuk mengatur keluar masuknya zat antar sel dengan lingkungan luar, melakukan pengangkutan zat-zat yang diperlukan aktif dan mengendalikan susunan dalam sel. Proses pengangkutan zat-zat yang diperlukan baik ke dalam maupun keluar sel dimungkinkan karena di dalam membran sel terdapat enzim protein untuk mensintesis peptidoglikan komponen membran luar. Dengan rusaknya dinding sel, bakteri secara otomatis akan berpengaruh pada membran sitoplasma, beberapa bahan antimikroba seperti fenol, kresol, detergen dan beberapa antibiotik dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel, bahan-bahan ini akan menyerang dan merusak membran sel sehingga fungsi semi

permeabilitas membran mengalami kerusakan. Kerusakan pada membran sel ini akan mengakibatkan terhambatnya sel atau matinya sel.

2.3. Mengganggu metabolisme mikroba. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari *Para Amino Benzoic Acid* (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antimikroba bila bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional sehingga kebutuhan akan asam folat tidak terpenuhi dan bisa menyebabkan bakteri mati. Contoh antibakteri yang bekerja menghambat metabolisme sel bakteri adalah sulfonamida dan trimetoprim.

2.4. Menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri. Antibakteri yang memiliki mekanisme kerja ini pada umumnya bersifat toksik kurang selektif, karena antibakteri ini bersifat sitotoksik yang masih dapat diterima sebagai antibakteri. Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini antara lain asam nalidiksat dan golongan kuinolon.

2.5. Menghambat sintesis protein sel bakteri. 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 yang abnormal dan fungsional bagi sel mikroba. Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini yaitu aktinomisin, rifampisin, streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, klindamisin dan gentamisin.

3. Metode uji antibakteri

Uji senyawa antibakteri adalah untuk mengetahui apakah suatu senyawa uji dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan mengukur respon pertumbuhan populasi mikroorganisme terhadap agen antibakteri. Obat yang digunakan untuk membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, bersifat sangat toksik untuk bakteri, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes (Pratiwi 2008).

3.1. Metode difusi. Metode ini dapat dilakukan dengan menggunakan cakram (disc) kertas saring, sumuran atau silinder tidak beralas. Metode dengan

sumuran atau silinder, dilakukan dengan memasukkan larutan uji dengan konsentrasi tertentu ke dalam sumuran. Metode cakram kertas saring berisi sejumlah obat yang ditempatkan pada permukaan medium padat, medium sebelum digunakan diolesi bakteri uji terlebih dahulu. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat. Metode difusi agar dipengaruhi oleh faktor fisika, kimia, faktor antar obat dan organisme (Jawetz *et al.* 2001).

3.2. Metode dilusi. Metode ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi penghambat terkecil dan juga untuk menetapkan konsentrasi bakterisidal terkecil dari suatu senyawa antimikroba (Tortora *et al.* 2007).

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap pada media cair maupun padat. Media diinokulasikan terhadap bakteri uji, selanjutnya diinkubasi dan diamati konsentrasi antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji. Keuntungan metode dilusi yaitu lebih teliti, untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) karena lebih mudah dan praktis serta memungkinkan adanya hasil kualitatif yang menunjukkan jumlah obat tertentu yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh organisme yang di uji (Jawetz *et al.* 2007).

4. Media uji

Pembiakan mikroba dalam laboratorium memerlukan medium yang berisi zat hara serta lingkungan pertumbuhan yang sesuai dengan mikroorganisme. Zat hara yang digunakan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme dan pergerakan. Lazimnya medium biakan berisi air, sumber energi, zat hara sebagai sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen dan hidrogen. Faktor pertumbuhan berupa asam amino, vitamin atau nukleotida dapat pula ditambahkan ke dalam bahan dasar medium (Waluyo 2008).

Konsistensi media dapat dibuat bermacam-macam berdasarkan pada keperluannya. Bentuk media ada 3 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 & Wijayani 2008).

5. Sterilisasi

Hampir semua media pada tindakan yang dilakukan dalam diagnosa mikrobiologis, sterilitas sangat diutamakan baik alat-alat yang dipakai maupun medianya. Alat atau bahan dikatakan steril bila bahan atau alat tersebut bebas dari mikroba, baik dalam bentuk vegetatif maupun bentuk spora. Tindakan untuk membebaskan alat atau media dari jasad renik disebut dengan sterilisasi. Cara sterilisasi yang dikenal dan pemilihan cara sterilisasi tergantung dari bahan atau alat yang akan disterilisasi. Cara sterilisasi tersebut dengan pemanasan, filtrasi, penyinaran dengan menggunakan sinar gelombang pendek (radiasi) atau dengan cara khemis (Widyarto 2009).

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

F. Kloramfenikol

Mekanisme kloramfenikol bertindak menghambat sintesis protein dengan cepat tanpa mengganggu sintesis DNA dan RNA. Kloramfenikol efektif terhadap bakteri Gram positif termasuk *Streptococcus pneumoniae* dan bakteri Gram negatif termasuk *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitis*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas mallei*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* dan *Brucella*. Sebagian besar bakteri Gram positif dihambat pada konsentrasi 1-10 $\mu\text{g/mL}$, sementara kebanyakan bakteri Gram negatif dihambat pada konsentrasi 0,2-5 $\mu\text{g/mL}$. Penggunaan kloramfenikol sebagai kontrol pembanding karena memiliki spektrum yang luas sebagai antibakteri (Katzung 2004).

G. Landasan Teori

Demam tifoid adalah demam yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif *S. typhi* yang hanya ditemukan pada manusia. Gejala yang ditimbulkan seperti demam, sakit perut, leukositosis, sembelit, pembesaran limfa dan diare (Radji & Biomed 2010). Pengobatan dengan antibiotik dapat menimbulkan efek samping maka mendorong dilakukannya penelitian penggunaan tanaman obat tradisional yang memiliki potensi sebagai antibakteri (Saepudin *et al.* 2007).

Salah satu tanaman obat tradisional yang digunakan adalah daun kenikir yang mengandung flavonoid, saponin, alkaloid dan tanin (Rasdi *et al.* 2010). Mekanisme antibakteri flavonoid yaitu akan membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Dewanti & Wahyudi 2011). Saponin merupakan senyawa antibakteri karena memiliki kemampuan dalam menghambat fungsi membran sel sehingga merusak permeabilitas membran yang mengakibatkan dinding sel rusak atau hancur (Chapagain & Wiesman 2005). Alkaloid bekerja dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Juliantina *et al.* 2008). Tanin berfungsi menghambat pertumbuhan bakteri dengan memunculkan denaturasi protein dan menurunkan tegangan permukaan (Sudirman 2014).

Metode penyarian daun kenikir yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut etanol 70% dan difraksinasi dengan *n*-heksana, etil asetat dan air. Etanol 70% dapat melarutkan alkaloid, minyak menguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakinin, flavonoid, steroid, damar, klorofil, tanin dan saponin (List 2000). *n*-heksana dapat melarutkan senyawa minyak atsiri, terpenoid, triterpenoid, sterol, asam lemak, alkaloid, karotenoid, klorofil dan resin (Depkes 2005). Etil asetat dapat melarutkan senyawa flavonoid, saponin, alkaloid dan polifenol (Harbone 2006). Air dapat melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tanin, gom, pati, protein, enzim, lilin, lemak, pektin dan zat warna asam organik (Depkes 2005). Penggunaan pelarut yang berbeda polaritasnya disebabkan kandungan senyawa kimia yang terdapat pada daun kenikir mempunyai polaritas

yang berbeda-beda sehingga dilakukan fraksinasi dan akan diketahui fraksi yang efektif terhadap *S. typhi* ATCC 13311.

Penelitian Putri (2010) menyatakan bahwa ekstrak metanol daun kenikir mempunyai aktivitas sebagai antibakteri terhadap *S. typhi*. Variasi konsentrasi yang digunakan adalah 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml dan 30 mg/ml. Konsentrasi 30 mg/ml merupakan konsentrasi yang paling efektif sebagai antibakteri terhadap *S. typhi* dengan zona hambat sebesar 24,2 mm.

Pengukuran aktivitas antibakteri pada penelitian ini dilakukan dengan metode difusi dan dilusi. Metode difusi menggunakan cakram (disc) dengan konsentrasi tertentu dengan cara menempelkan cakram pada permukaan medium padat sesudah diolesi bakteri uji lalu diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37⁰C. Metode dilusi yaitu metode dengan konsentrasi menurun secara bertahap dengan media cair, kemudian larutan uji diinokulasikan pada media serta ditambah bakteri uji lalu diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37⁰C (Jawetz *et al.* 2001).

H. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori, maka dirumuskan hipotesis sebagai berikut :

Pertama, hasil fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun kenikir mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* ATCC 13311.

Kedua, fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif menghambat *S. typhi* ATCC 13311 yaitu fraksi etil asetat.

Ketiga, diameter hambat yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dalam menghambat *S. typhi* ATCC 13311 ditentukan dari hasil penelitian.

Keempat, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi etil asetat dalam menghambat *S. typhi* ATCC 13311 ditentukan dari hasil penelitian.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kenikir yang diambil dari populasi secara acak. Tanaman kenikir yang diambil memiliki daun yang tua, berwarna hijau, diambil dari tanaman yang masih segar, terbebas dari hama yang diperoleh di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada November 2016.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak daun kenikir.

Variabel utama kedua adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak daun kenikir terhadap *S. typhi* ATCC 13311.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel kendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun kenikir.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri uji *S. typhi* ATCC 13311 yang dipengaruhi oleh ekstrak etanol 70%, *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun kenikir.

Variabel kendali adalah 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 adalah kemurnian bakteri uji *S. typhi* ATCC 13311, kondisi laboratorium meliputi kondisi inkas, alat dan bahan yang harus steril, suhu inkubasi, waktu inkubasi, sterilisasi, media yang digunakan, waktu panen, metode ekstraksi dan kondisi fisik peneliti.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kenikir adalah daun dari tanaman kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun kenikir adalah daun kenikir yang diambil kemudian dicuci pada air mengalir guna membersihkan kotoran yang masih menempel setelah itu dipotong-potong dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40⁰C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun kenikir adalah serbuk daun kenikir yang diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah ekstrak dari etanol 70% daun kenikir yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut non polar.

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

Keenam, fraksi air adalah fraksinasi dari residu fraksi etil asetat dengan menggunakan air sebagai pelarut polar.

Ketujuh, bakteri uji *S. typhi* ATCC 13311 adalah bakteri yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri adalah menggunakan metode difusi dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%. Kontrol positif adalah disc antibiotik kloramfenikol dan kontrol negatif larutan DMSO 5%. Metode difusi digunakan

untuk menentukan diameter zona hambat atau garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi cakram yang berisi bahan uji dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri.

Kesembilan, uji aktivitas antibakteri adalah menggunakan metode dilusi dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,562%; 0,781%. Kontrol positif adalah suspensi bakteri dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kontrol negatif adalah larutan fraksi teraktif daun kenikir. Metode dilusi digunakan untuk mengukur Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

1.1. Alat untuk pembuatan dan analisis serbuk simplisia. Alat yang digunakan pembuatan serbuk simplisia adalah timbangan, oven, blender, ayakan no. 40, dan *sterling-bidwell*.

1.2. Alat maserasi. Alat yang digunakan untuk maserasi adalah botol berwarna coklat, gelas ukur, kain flanel dan kertas saring, *vaccum rotary evaporator* dan *waterbath*.

1.3. Alat uji aktivitas antibakteri. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah ose platina, cawan petri, inkas, tabung reaksi, pipet tetes, lampu spiritus, *autoclave*, inkubator, kaca objek, mikroskop dan penggaris.

1.4. Alat identifikasi kandungan senyawa. Alat yang digunakan untuk identifikasi senyawa adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, penjepit tabung, lampu spiritus, corong kaca, beakerglass dan gelas ukur.

2. Bahan

2.1. Bahan utama. Bahan utama yang digunakan adalah tanaman kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2.2. Bahan kimia. Bahan yang digunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat, etanol 70%, aquadestilata, HCl 2N, FeCl₃ 1%, larutan Mayer, larutan Dragendrof, asam sulfat pekat, asam asetat pekat, serbuk Mg, reagen Ehrlich, NaCl, cat kristal

violet, larutan lugol iodine, safranin, larutan DMSO 5%, disc antibiotik kloramfenikol dan larutan standar Mc Farland 0,5.

2.3. Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *S. typhi* ATCC 13311.

2.4. Media. Media yang digunakan adalah KIA (*Kliger Iron Agar*), SIM (*Sulfida Indol Motilitas*), LIA (*Lysin Iron Agar*), Sitrat , BHI (*Brain Heart Infusion*), BSA (*Bismuth Sulfit Agar*) dan MHA (*Mueller Hinton Agar*).

D. Jalan Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama penelitian adalah determinasi tanaman yang dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman kenikir sesuai kepustakaan dan dibuktikan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

2. Pembuatan serbuk simplisia

Pembuatan serbuk daun kenikir dilakukan dengan cara daun kenikir dicuci bersih terlebih dahulu dengan air mengalir sampai terbebas dari kotoran dan debu. Daun kenikir yang sudah bersih dipotong–potong lalu diangin-anginkan kemudian ditimbang, setelah itu dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 40⁰C. Daun kenikir yang sudah kering diserbuk dengan alat penyerbuk kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh serbuk daun kenikir yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen. Pembuatan serbuk bertujuan agar luas partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sampai penyarian berlangsung seara efektif.

3. Kadar air serbuk daun kenikir

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara menimbang serbuk daun kenikir sebanyak 20 gram yang dimasukkan dalam labu destilasi yang sudah terisi batu didih dan ditambahkan pelarut xylen sampai serbuk terendam kemudian memasang alat *sterling-bidwell*. Panaskan labu dengan hati-hati, dipanaskan dengan api kecil sampai mendidih. Pemanasan dihentikan ketika kadar air dari serbuk daun kenikir sudah tidak menetes kembali pada gelas ukur alat *sterling-*

bidwell. Kadar air memenuhi syarat di mana suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%.

4. Pembuatan ekstrak daun kenikir

Maserasi dilakukan dengan perbandingan 10 bagian simplisia dimasukkan ke dalam 75 bagian cairan penyari. Serbuk daun kenikir ditimbang sebanyak yang didapatkan dari pengeringan kemudian dimasukkan ke dalam botol coklat dan ditambahkan pelarut etanol 70%. Selanjutnya campuran tersebut didiamkan selama 5 hari sambil sesekali digojog. Filtrat dengan ampas dipisahkan dengan menggunakan kain flanel. Ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Filtrat yang didapat kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40⁰C dan *waterbath* sehingga didapat ekstrak kental daun kenikir. Hitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak (Depkes 2006).

5. Uji bebas etanol

Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat pekat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol ditandai dengan tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol. Tujuan dilakukannya uji bebas etanol ini bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri (Praeparandi 2006).

6. Fraksinasi

Pembuatan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dilakukan dengan cara diambil ekstrak etanol yang sudah didapatkan kemudian didispersikan dengan air : etanol dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian difraksinasi dengan *n*-heksana. Fraksinasi *n*-heksana dilakukan sebanyak tiga kali. Sari yang didapat dari fraksinasi *n*-heksana dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40⁰ C. Hasil fraksinasi ini disebut fraksi *n*-heksana.

Lapisan sisa fraksinasi *n*-heksana kemudian ditambah dengan etil asetat. Fraksinasi etil asetat sebanyak tiga kali. Hasil yang didapat dari fraksinasi etil

asetat dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40⁰C. Hasil fraksi ini disebut fraksi etil asetat. Sisa hasil fraksinasi *n*-heksana dan etil asetat kemudian dipekatkan dengan cara diuapkan di atas penangas air, hasilnya disebut fraksi air.

7. Pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun kenikir

Preparasi pembuatan larutan serbuk dengan cara serbuk dan akuadestilata dicampurkan kemudian dipanaskan dan disaring, hasil larutan kemudian dapat diujikan. Preparasi pembuatan larutan uji ekstrak dan fraksi dengan cara ekstrak dan atau hasil fraksi dilarutkan dengan etanol 70%, hasil larutan kemudian dapat diujikan. Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam daun kenikir. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa flavonoid, saponin, alkaloid dan tanin.

7.1. Identifikasi flavonoid. Bahan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 10 tetes asam klorida pekat. Reaksi positif bila dibandingkan dengan larutan standart yang jernih akan menunjukkan dengan adanya warna merah atau kuning atau jingga (Depkes 2005).

7.2. Identifikasi saponin. Bahan uji dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan sebanyak 10 mL air suling panas, didinginkan, dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Depkes 2005).

7.3. Identifikasi alkaloid. Bahan uji dilarutkan dalam air panas lalu dipanaskan selama 15 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh disebut larutan A. Dimasukkan larutan A sebanyak 5 ml dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan 1,5 ml asam klorida 2%, larutan dibagi kedalam 2 tabung dan masing-masing sama banyak. Tabung reaksi pertama ditambah 2 tetes reagent Dragendorf, reaksi positif ditunjukkan adanya keruh atau endapan coklat, tabung reaksi kedua ditambah 2-4 tetes larutan Mayer, reaksi positif ditunjukkan adanya endapan putih kekuningan (Alamsyah 2006).

7.4. Identifikasi tanin. Bahan uji dicampurkan dengan aquadestilata sampai terendam dan dipanaskan selama 3 sampai 5 menit. Kemudian ditambahkan 2 tetes FeCl_3 1%. Perubahan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Ramya *et al.* 2012).

8. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang digunakan harus dalam keadaan steril. Cawan petri, pipet tetes, tabung reaksi, labu erlenmeyer, vial, beakerglass dan gelas ukur disterilkan menggunakan oven pada suhu $150-170^{\circ}\text{C}$ selama 30-60 menit. Ose platina disterilkan dengan pembakaran yaitu dengan membakarnya sampai pijar dengan lampu spiritus. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-30 menit.

9. Identifikasi bakteri uji

9.1. Identifikasi secara goresan. Bakteri uji *S. typhi* ATCC 13311 dalam biakan murni diambil satu ose kemudian dimasukkan tabung yang berisi *Brain Heart Infusion* (BHI), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Identifikasi bakteri uji *S. typhi* ATCC 13311, biakan bakteri diinokulasi secara perataan pada media *Bismuth Sulfit Agar* (BSA), diinkubasi selama 18-24 jam suhu 37°C (Koneman *et al.* 1983).

9.2. Identifikasi secara pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram negatif *S. typhi* ATCC 13311 menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai pengintensif warna), Gram C (etanol : aseton = 1:1 sebagai peluntur warna), Gram D (cat safranin sebagai cat penutup). Bakteri dinyatakan Gram negatif apabila berwarna merah di bawah mikroskop (Koneman *et al.* 1983).

9.3. Identifikasi secara biokimia. Identifikasi berdasarkan uji biokimia, medium yang digunakan yaitu SIM, KIA, LIA dan Sitrak.

Uji pada media SIM (*Sulfida Indol Motility*), biakan murni bakteri diinokulasi pada permukaan media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C . Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri. Uji positif pada *S. typhi* ATCC 13311 ditandai dengan uji sulfida maka media berwarna hitam, uji indol tidak

terbentuk cincin indol warna merah setelah ditambah reagen Ehrlich dan uji motilitas terjadi pertumbuhan bakteri yang menyebar pada seluruh media (Koneman *et al.* 1983).

Uji pada media KIA (*Kliger Iron Agar*), biakan bakteri diinokulasikan dengan cara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa), ada tidaknya gas dan sulfide. Uji positif pada *S. typhi* ATCC 13311 ditandai dengan bagian lereng akan berwarna merah maka ditulis K, bagian dasar berwarna kuning ditulis A, terbentuk warna hitam pada medium maka ditulis S(+) dan adanya gas ditandai dengan pecahnya atau terperangkap medium keatas ditulis G(+) (Koneman *et al.* 1983).

Uji pada media LIA (*Lysine Iron Agar*), inokulasi bakteri dengan cara tusukan dan goresan, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji diaminasi lisin dan sulfide. Uji positif pada *S. typhi* ATCC 13311 ditandai dengan bagian lereng akan berwarna ungu maka ditulis K dan medium berwarna hitam maka ditulis S(+) (Koneman *et al.* 1983).

Uji pada media Sitrat, bakteri diinokulasikan dengan cara goresan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif pada *S. typhi* ATCC 13311 ditandai dengan media berwarna biru (Koneman *et al.* 1983).

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *S. typhi* ATCC 13311 dalam biakan murni diambil 2 ose steril kemudian dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril yang sudah berisi 5 ml BHI (*Brain Heart Infusion*). BHI (*Brain Heart Infusion*) digunakan untuk mengencerkan suspensi bakteri sampai kekeruhannya setara dengan larutan standar Mc. Farland 0,5 (biakan cair yang kekeruhannya setara dengan Mc. Farland mempunyai populasi 1,5x10⁸ CFU/mL), kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam dengan tujuan untuk mendapatkan bakteri yang lebih banyak, selanjutnya digunakan untuk identifikasi.

11. Pengujian daya antibakteri dengan metode difusi

Metode difusi dilakukan dengan menggunakan cawan petri steril yang diisi dengan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan meletakkan cakram yang sudah dijenuhkan dengan larutan stok. Pertama ambil biakan bakteri dalam media BHI dengan kapas lidi steril dan digoreskan pada medium MHA secara merata, lalu diamkan 10 menit agar suspensi biakan terdifusi ke media. Kemudian membuat larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dengan masing-masing konsentrasi 50 %; 25% dan 12,5% menggunakan pelarut DMSO 5%. Selanjutnya kertas cakram yang telah dijenuhkan dari semua konsentrasi kemudian diletakkan pada media MHA yang sudah diolesi bakteri dan diletakkan sesuai dengan bagian masing-masing, cakram 1 diisi ekstrak, cakram 2 diisi fraksi *n*-heksana, cakram 3 diisi fraksi etil asetat, cakram 4 diisi fraksi air, cakram 5 diisi larutan DMSO 5% dan cakram 6 diisi disc antibiotik kloramfenikol. Cakram ke 5 sebagai kontrol negatif sedangkan cakram ke 6 sebagai kontrol positif. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, lalu diamati terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar kertas cakram menandakan bahwa kandungan kimia memiliki daya hambat terhadap bakteri. Pengujian dilakukan dengan 3 kali replikasi.

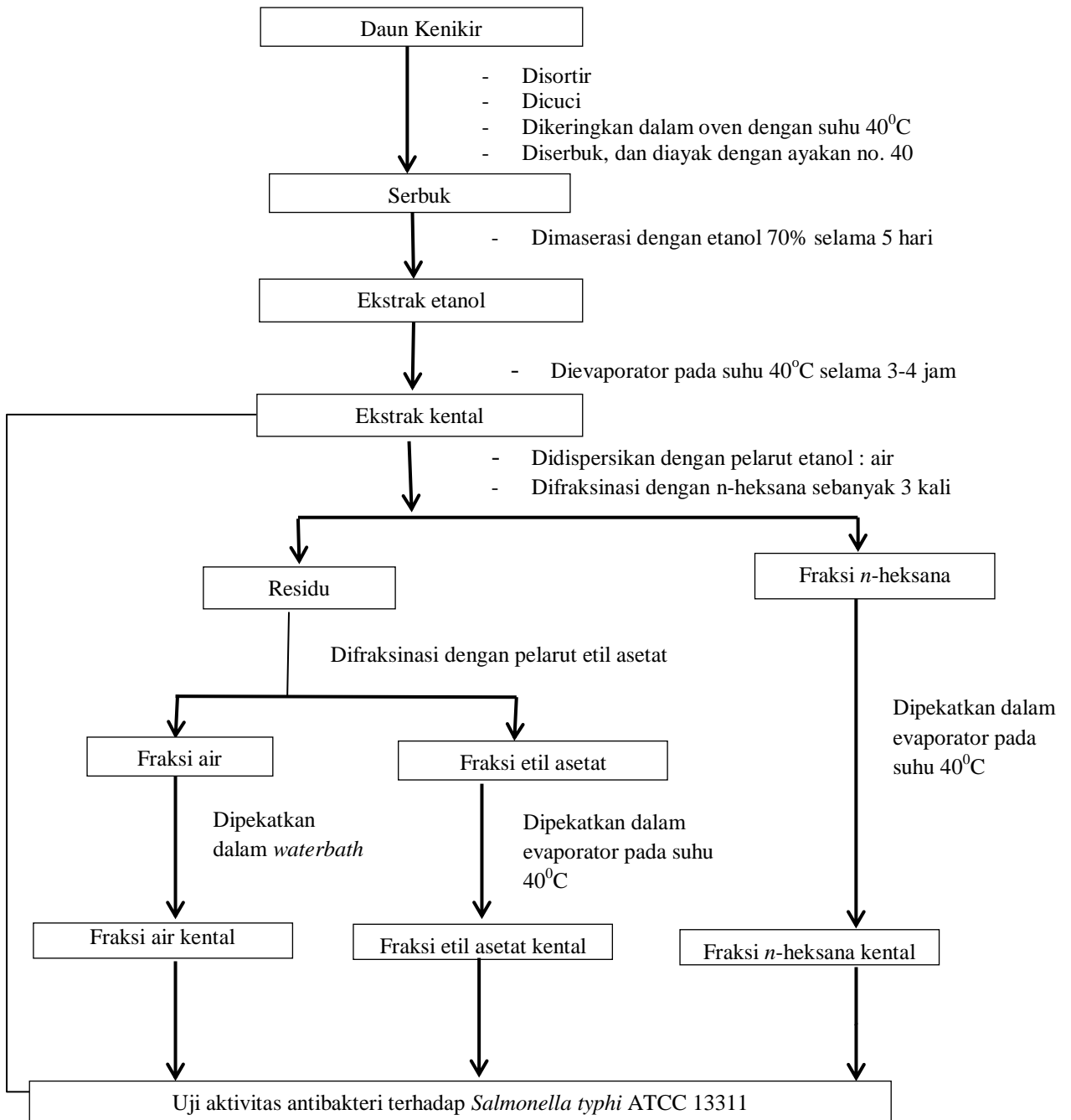
12. Pengujian daya antibakteri dengan metode dilusi

Metode dilusi dilakukan dengan memasukkan bahan uji ke dalam masing-masing tabung reaksi kecuali tabung sebagai kontrol positif dan tabung sebagai kontrol negatif. Pembuatan larutan stok fraksi teraktif menggunakan pelarut DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 5%. Masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa konsentrasi pengenceran yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,562%; 0,781%. Masing-masing tabung diisi 0,5 ml media BHI dari tabung 3 sampai 8, secara aseptik, ke dalam tabung 1 ditambahkan 1,0 ml larutan stok fraksi teraktif yang akan diperiksa, kemudian tabung 2 dimasukkan 1,0 ml larutan stok fraksi teraktif, kemudian dari tabung 2 diambil 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung 3 begitu seterusnya sampai tabung 8 kemudian dibuang, tambahkan 0,5 ml biakan yang akan diperiksa yang telah diencerkan 1:1000 dari biakan yang

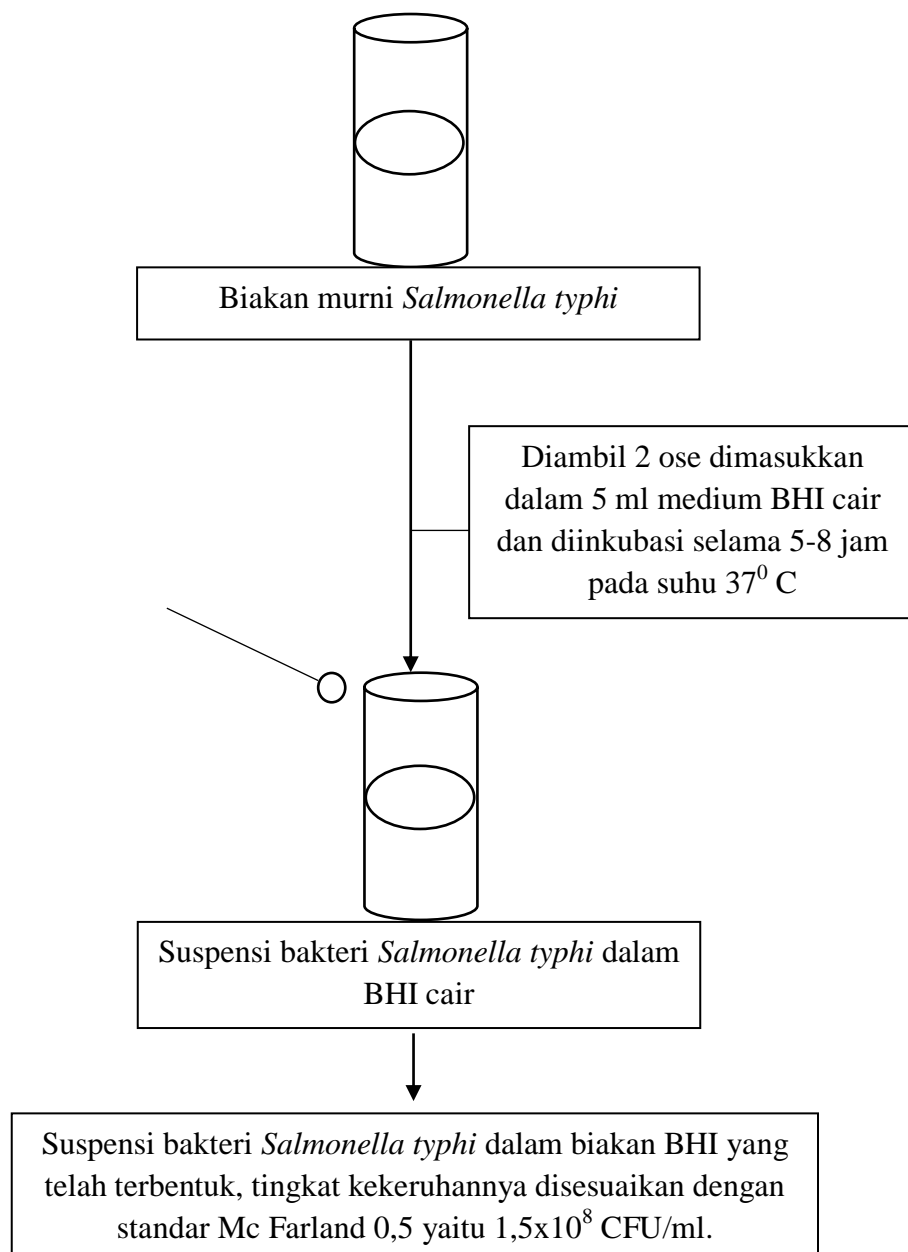
telah dieramkan dari tabung 2 sampai tabung 8. Tabung 9 dimasukkan bakteri sebanyak 1 ml. Tabung pertama berlaku sebagai kontrol negatif sedangkan tabung terakhir sebagai kontrol positif. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan melihat batas terendah tabung media yang jernih atau yang memberikan hasil negatif sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 18-24 jam. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh. Pengujian dilakukan dengan 3 kali replikasi.

E. Analisis Hasil

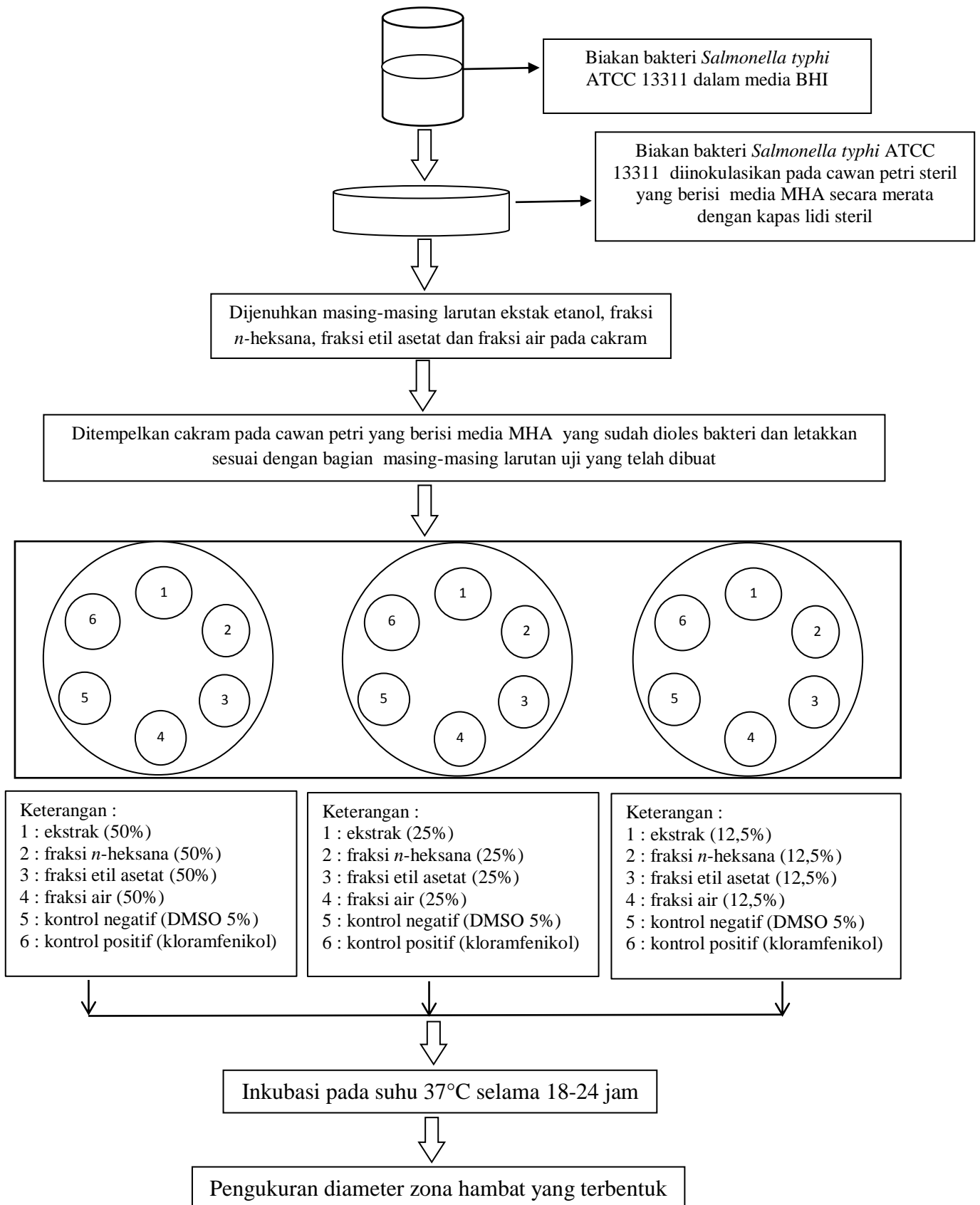
Data aktivitas antibakteri antar fraksi ekstrak etanol daun kenikir diuji secara statistik dengan Analisis of Varian (ANOVA) dengan menggunakan *software* SPSS pada konsentrasi yang sama untuk data hasil uji difusi. Metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji distribusi normal (*Kolmogorov-Smirnov*), jika data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan metode uji non parametrik, sedangkan jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA).



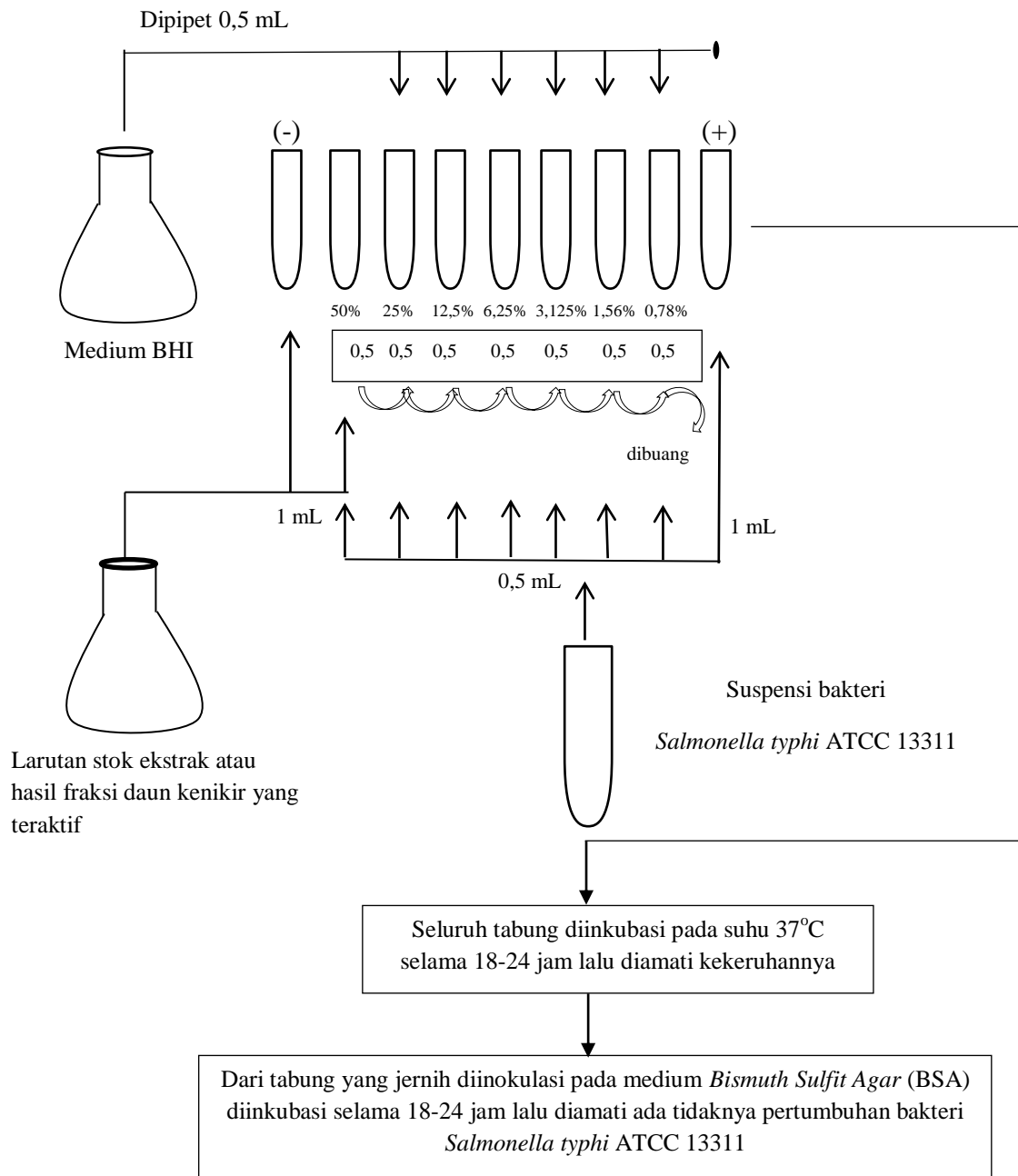
Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.)



Gambar 3. Skema pembuatan suspensi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311



Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun kenikir terhadap *S. typhi* ATCC 13311 dengan metode difusi.



Gambar 5. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun kenikir terhadap *S. typhi* ATCC 13311 dengan metode dilusi.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.)

Determinasi tanaman kenikir dilakukan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta. Berdasarkan hasil determinasi diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar tanaman kenikir. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan digunakan untuk penelitian dengan cara mencocokkan ciri-ciri tanaman yang tercantum dalam literatur, untuk menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan dan menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain.

Berdasarkan hasil determinasi dengan keterangan surat No : 102/DET/UPT-LAB/13/XI/2016 dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.). Surat keterangan hasil determinasi tanaman kenikir dapat dilihat dalam lampiran 1.

2. Pembuatan serbuk daun kenikir

Daun kenikir yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir sampai terbebas dari kotoran. Daun kenikir yang sudah bersih dipotong-potong lalu diangin-anginkan kemudian ditimbang, setelah itu dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40⁰C. Proses pengeringan dimaksudkan mengurangi kadar air untuk mencegah terjadinya pembusukan yang disebabkan oleh jamur dan bakteri, mencegah terjadinya reaksi enzimatik yang dapat menurunkan mutu serbuk, dan mempermudah untuk pembuatan serbuk.

Daun kenikir yang sudah dikeringkan kemudian dibuat serbuk dengan tujuan untuk memperkecil partikel yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung efektif. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah daun kenikir dapat dilihat pada tabel 1. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun kenikir dapat dilihat pada lampiran 9.

Tabel 1. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah daun kenikir

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
10000	2350	23,5

3. Penetapan kadar air serbuk daun kenikir

Penetapan kadar air serbuk daun kenikir dilakukan menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Persentase kadar air yang baik adalah kurang dari 10%. Kadar air yang terlalu tinggi tidak diperbolehkan karena dapat mempermudah jamur dan mikroorganisme lainnya tumbuh serta dapat menyebabkan perubahan kimiawi yang dapat merusak dan menurunkan mutu serbuk (Katno *et al.* 2008). Hasil penetapan kadar air serbuk daun kenikir dapat dilihat pada tabel 2. Perhitungan persentase penetapan kadar air serbuk daun kenikir dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar air serbuk daun kenikir

No	Bobot serbuk (gram)	Volume air (ml)	Kadar air (%)
1	20	1,6	8,0
2	20	1,5	7,5
3	20	1,6	8,0
Rata-rata			7,83

Hasil rata-rata persentase penetapan kadar air serbuk daun kenikir adalah 7,83%, sehingga telah memenuhi syarat yang telah ditentukan yaitu kurang dari 10%.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun kenikir

Metode pembuatan ekstrak pada penelitian ini dengan menggunakan cara maserasi (1:10). Serbuk daun kenikir ditimbang sebanyak 900 gram, dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat kemudian direndam dengan etanol 70% sebanyak 6750 ml, ditutup rapat dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya matahari, dengan pengocokan 3 kali sehari. Cairan hasil ekstraksi disaring dengan kain flanel. Ampas kemudian dicuci kembali dengan etanol 70% sebanyak 2250 ml. Filtrat yang didapat kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40⁰C dan *waterbath* sehingga didapat ekstrak kental daun kenikir. Organoleptis ekstrak berwarna coklat tua pekat, bentuk kental dan bau khas aromatik. Hasil persen rendemen ekstrak etanol daun kenikir dapat dilihat pada tabel 3. Perhitungan persen rendemen ekstrak etanol daun kenikir dapat dilihat di lampiran 11.

Tabel 3. Hasil persen rendemen ekstrak etanol daun kenikir

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
900	197,9	21,9

5. Uji bebas etanol ekstrak daun kenikir

Uji bebas etanol dilakukan dengan tes esterifikasi etanol ekstrak daun kenikir. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun kenikir dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun kenikir

Pustaka	Hasil
Tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 2006).	Tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol

Hasil uji bebas etanol menunjukkan bahwa ekstrak daun kenikir sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol yang ditunjukkan dengan tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol. Uji bebas etanol ini bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri.

6. Fraksinasi daun kenikir

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan kandungan golongan utama yang satu dengan golongan utama yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Pemisahan jumlah dan jenisnya menjadi fraksi yang berbeda, mula-mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari pelarut semi polar dan yang terakhir disari dengan pelarut polar (Harbone 2006).

Fraksinasi ekstrak etanol daun kenikir dilakukan dengan menggunakan 3 pelarut yang berbeda berdasarkan perbedaan polaritasnya, pelarut non polar yang digunakan adalah *n*-heksana, pelarut semi polar yang digunakan etil asetat dan pelarut polarnya yaitu air. Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang ekstrak 10 gram ekstrak etanol daun kenikir dari hasil maserasi kemudian difraksinasi dengan pengulangan sebanyak 3 kali dan fraksinasi dilakukan sebanyak 9 kali, sehingga total penggunaan ekstrak untuk fraksinasi sebesar 90 gram. Pengulangan

dimaksudkan untuk meningkatkan efisiensi dari proses penyarian senyawa. Penyarian yang baik diperoleh apabila diperoleh jumlah ekstraksi yang dilakukan berulang dengan penambahan jumlah pelarut sedikit demi sedikit (Khopkar 2003). Hasil persen rendemen fraksinasi daun kenikir dilihat pada tabel 5. Perhitungan persen rendemen fraksinasi daun kenikir dapat dilihat pada lampiran 12.

Tabel 5. Hasil persen rendemen fraksinasi daun kenikir

Ekstrak etanol (gram)	Pelarut	Hasil fraksi (gram)	Rendemen (%)
90	<i>n</i> -heksana	10,11	11,23
	Etil asetat	21,18	23,53
	Air	39,97	44,41

Tabel 5 menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana sebanyak 10,11 gram dengan rendemen 11,23%, fraksi etil asetat sebanyak 21,18 gram dengan rendemen 23,53%, dan fraksi air sebanyak 39,97 gram dengan rendemen 44,41%. Rendemen yang didapat pada setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam daun kenikir. Hasil fraksinasi yang diperoleh tidak mencapai 90 gram, hal ini disebabkan karena dari proses penimbangan ekstrak hingga penimbangan fraksi mungkin ada yang menempel pada alat - alat yang digunakan.

7. Pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun kenikir

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan pada serbuk, ekstrak dan fraksi. Identifikasi kandungan senyawa kimia ini dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung di dalam daun kenikir. Hasil pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun kenikir dapat dilihat pada tabel 6. Foto pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun kenikir dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 6. Hasil pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun kenikir

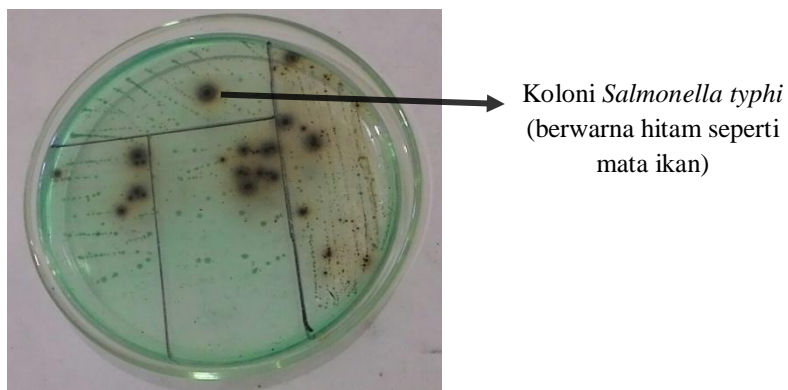
Kandungan kimia	Pustaka	Interpretasi hasil				
		serbuk	ekstrak	fraksi		
n-heksana	etil asetat			air		
Flavonoid	larutan merah atau kuning atau jingga pada amil alcohol (Depkes 2005).	+	+	-	+	-
Saponin	buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm (Depkes 2005).	+	+	-	+	+
Alkaloid	endapan coklat pada reagen Dragendorf dan endapan putih kekuningan pada reagen Meyer (Alamsyah 2006).	+	+	+	+	+
Tanin	larutan hijau kehitaman (Ramya <i>et al.</i> 2012).	+	+	+	+	+

Keterangan :
 + : mengandung golongan senyawa
 - : tidak mengandung golongan senyawa

Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat bahwa hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol daun kenikir positif mengandung flavonoid, saponin, alkaloid dan tanin di mana senyawa tersebut diduga memiliki aktivitas antibakteri. Fraksi yang dilakukan adalah semua hasil fraksi yaitu *n*-heksana, etil asetat dan air. Fraksi *n*-heksana memberikan hasil positif pada senyawa alkaloid dan tanin, etil asetat memberikan hasil positif pada flavonoid, saponin, alkaloid dan tanin, sedangkan saponin, alkaloid dan tanin menunjukkan positif pada fraksi air.

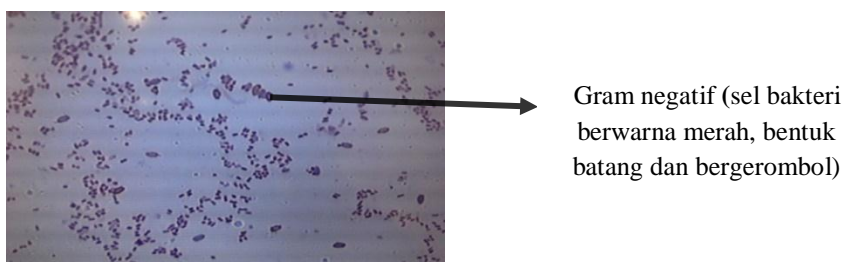
8. Identifikasi bakteri uji *S. typhi* ATCC 13311

8.1. Identifikasi secara goresan. Bakteri uji *S. typhi* ATCC 13311 dalam biakan murni diambil satu ose kemudian dimasukkan tabung yang berisi *Brain Heart Infusion* (BHI), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Identifikasi bakteri uji *S. typhi* ATCC 13311, biakan bakteri diinokulasi secara perataan pada media *Bismuth Sulfit Agar* (BSA), diinkubasi selama 18-24 jam suhu 37°C. Hasil pengamatan menunjukkan koloni berwarna hitam seperti mata ikan hal ini disebabkan adanya ferro sulfat yang terdapat pada media BSA. Hasil identifikasi secara goresan *S. typhi* ATCC 13311 dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Foto identifikasi secara goresan *S. typhi* ATCC 13311

8.2. Identifikasi secara pewarnaan Gram. Pewarnaan gram bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan tersebut golongan Gram negatif. Gram negatif didapatkan apabila sel bakteri berwarna merah, bentuk batang dan bergerombol berarti positif golongan *S. typhi*. Penetasan kristal violet atau Gram A menyebabkan kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram negatif dan positif. Penetasan mordant atau lugol iodine atau Gram B menyebabkan adanya ikatan kristal violet dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Penetasan Gram C atau etanol : aseton menyebabkan terbentuknya pori-pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut etanol) sehingga kompleks kristal violet-iodine tidak menempel di dinding sel yang menyebabkan sel Gram negatif menjadi bening. Penetasan safranin atau Gram D akan mewarnai Gram negatif menjadi warna merah. Hasil identifikasi secara pewarnaan Gram *S. typhi* ATCC 13311 dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Foto identifikasi secara pewarnaan Gram negatif *S. typhi* ATCC 13311

8.3. Identifikasi secara biokimia. Hasil identifikasi uji biokimia pada *S. typhi* ATCC 13311 dapat dilihat pada tabel 7 dan gambar 8.

Tabel 7. Hasil identifikasi uji biokimia pada *S. typhi* ATCC 13311

Media uji	Pustaka	Hasil
SIM	+ - +	+ - +
KIA	K/A S(+) G(+)	K/A S(+) G(+)
LIA	K/K S(+)	K/K S(+)
Sitrat	+	+

Keterangan :

SIM	= <i>Sulfida Indol Motilitas</i>	A	= Alkali (kuning)
KIA	= <i>Kliger Iron Agar</i>	K	= Alkali (merah atau ungu)
LIA	= <i>Lysin Iron Agar</i>	G	= Gas (media terangkat)
+	= Reaksi positif	S	= Sulfida (hitam)
-	= Reaksi negatif		

Hasil pengujian pada media SIM (*Sulfida Indol Motility*) bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri. Pengujian dengan biakan murni bakteri diinokulasi pada permukaan media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰C menunjukkan hasil (+ - +). Hasil (+) artinya pada uji sulfida media berwarna hitam karena *S. typhi* dapat mereduksi thiosulfat sehingga menghasilkan H₂S, hasil (-) artinya pada uji indol tidak terbentuk cincin indol warna merah pada permukaan media setelah ditambah reagen Ehrlich tiga tetes dan hasil (+) artinya pada uji motilitas terjadi pertumbuhan bakteri yang menyebar pada seluruh media (Koneman *et al.* 1983).

Hasil pengujian pada media KIA (*Kliger Iron Agar*) bertujuan untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa), ada tidaknya gas dan sulfide. Pengujian dengan biakan murni bakteri diinokulasi secara tusukan dan goresan kemudian di inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰C menunjukkan hasil K/A S(+) G(+). Hasil (K) artinya pada bagian lereng akan berwarna merah, (A) artinya pada bagian dasar berwarna kuning karena bakteri tidak memfermentasi glukosa dan laktosa, hasil S(+) artinya terbentuk warna hitam pada medium karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media, hasil G(+) artinya terbentuknya gas yang ditandai dengan pecahnya atau terperangkap medium ke atas (Koneman *et al.* 1983).

Hasil pengujian pada media LIA (*Lysine Iron Agar*) bertujuan untuk menguji diaminasi lisin dan sulfide. Pengujian dengan biakan murni bakteri diinokulasi dengan cara tusukan dan goresan, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰C menunjukkan hasil K/K S(+). Hasil (K/K) artinya pada bagian lereng dan dasar media akan berwarna ungu hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) diseluruh media, hasil S(+) artinya medium berwarna hitam karena terbentuknya H₂S (Koneman *et al.* 1983).

Hasil pengujian pada media Sitrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian dengan biakan murni bakteri diinokulasi secara goresan, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37⁰C menunjukkan hasil (+). Hasil (+) artinya media berwarna biru karena pada media Sitrat terdapat indikator BTB (*Brom Tymol Blue*) yang merupakan indikator pH jika mikroba mampu menggunakan sitrat menyebabkan suasana basa sehingga terjadi peningkatan pH dan perubahan warna media dari hijau menjadi biru (Koneman *et al.* 1983).



Gambar 8. Foto identifikasi uji biokimia *S. typhi* ATCC 13311

9. Pengujian daya antibakteri dengan metode difusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi menggunakan metode difusi yang bertujuan untuk mengetahui daya hambat pertumbuhan dari bakteri uji. Pengujian antibakteri terhadap *S. typhi* ATCC 13311 menggunakan ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat dan air dari daun kenikir untuk mengetahui fraksi paling efektif. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian ini adalah 50%; 25% dan 12,5% dengan menggunakan pembanding antibiotik kloramfenikol sebagai kontrol positif dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Perhitungan dan pembuatan

konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi daun kenikir metode difusi dapat dilihat pada lampiran 13. Kekeruhan suspensi bakteri uji disesuaikan dengan standard Mc Farland 0,5. Metode difusi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode disc cakram, sehingga sebelumnya disc direndam dalam larutan uji dan ditunggu hingga jenuh (± 1 jam). Masa inkubasi pengujian aktivitas antibakteri selama 18-24 jam pada suhu 37°C , daya hambat yang terbentuk berupa warna jernih disekitar daerah disc dalam ukuran mm.

Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol 70% daun kenikir memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* ATCC 13311. Hasil diameter hambat uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun kenikir metode difusi dapat dilihat pada tabel 8. Foto uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun kenikir terhadap *S. typhi* ATCC 13311 metode difusi dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 8. Hasil diameter hambat uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun kenikir metode difusi

Sampel	Konsentrasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata \pm SD
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	50%	18	17	19	18,00 \pm 1,00
	25%	19	20	19	19,33 \pm 0,58
	12,5%	16	16	14	15,33 \pm 1,15
<i>n</i> -Heksana	50%	13	12	15	13,33 \pm 1,53
	25%	18	15	16	16,33 \pm 1,53
	12,5%	10	12	13	11,67 \pm 1,53
Etil asetat	50%	25	24	23	24,00 \pm 1,00
	25%	25	24	25	24,67 \pm 0,58
	12,5%	20	20	20	20,00 \pm 0,00
Air	50%	18	15	16	16,33 \pm 1,53
	25%	19	18	17	18,00 \pm 1,00
	12,5%	13	14	15	14,00 \pm 1,00
Kloramfenikol	2,5%	30	29	29	29,33 \pm 0,58
DMSO	5%	0	0	0	0,00 \pm 0,00

Berdasarkan tabel 8 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai daya hambat paling besar terhadap *S. typhi* ATCC 13311 daripada fraksi *n*-heksana, air dan ekstrak daun kenikir. Hasil rata-rata diameter daya hambat fraksi etil asetat konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% berturut-turut adalah 24,00 mm, 24,67 mm dan 20,00 mm sedangkan kloramfenikol selaku kontrol positif memiliki rata-rata 29,33 mm. Kontrol negatif dalam pengujian aktivitas antibakteri

menggunakan DMSO 5% dan berdasarkan hasil dari pengujian yang telah dilakukan bahwa DMSO 5% tidak memiliki daya hambat terhadap *S. typhi* ATCC 13311.

Perhitungan statistik yang digunakan adalah anova *oneway* untuk membandingkan kontrol positif, kontrol negatif, ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak daun kenikir pada setiap konsentrasi. Tabel *Homogeneous Subsets* terbagi dalam 8 subset, tabel ini bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Subset 1 terdapat kontrol negatif dan subset 2 sampai 7 terdapat sediaan uji dengan konsentrasi yang berbeda-beda pula. Subset 7 hanya terdapat fraksi etil asetat 25% dan 50%, sehingga diketahui bahwa fraksi etil asetat 25% merupakan fraksi paling aktif. Diameter hambat konsentrasi 50% lebih kecil dibanding 25%, hal ini dikarenakan sediaan 50% lebih pekat sehingga zat aktif akan sulit berdifusi dalam media padat. Subset 8 terdapat kontrol positif, dari berbagai subset diketahui bahwa subset 1 sampai 8 mempunyai beda nyata dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Hal ini berbeda dengan sediaan uji yang termasuk dalam satu subset tidak mempunyai beda secara signifikan dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Tabel *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada lampiran 17.

Fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif karena memiliki daya hambat lebih besar terhadap *S. typhi* ATCC 13311 dibandingkan ekstrak, fraksi *n*-heksana dan air. Ekstrak etanol mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun kenikir, akan tetapi senyawa-senyawa tersebut ternyata tidak mampu bekerja secara sinergis sehingga daya hambat yang terbentuk lebih kecil. Fraksi *n*-heksana memiliki aktivitas penghambatan paling rendah, kemungkinan disebabkan karena senyawa yang terlarut dalam fraksi hanya alkaloid dan tanin yang memiliki aktivitas antibakteri yang belum bisa bekerja secara optimum sehingga aktivitas antibakterinya masih rendah. Fraksi etil asetat memiliki daya hambat paling besar terhadap *S. typhi* ATCC 13311, hal ini dikarenakan kemungkinan etil asetat mampu menarik senyawa yang paling aktif sebagai antibakteri dibandingkan dengan fraksi yang lain. Senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat adalah

flavonoid, saponin, alkaloid dan tanin. Fraksi air mampu menarik senyawa saponin, tanin dan alkaloid, meskipun fraksi ini menarik senyawa yang banyak akan tetapi fraksi ini memiliki aktivitas penghambatan yang lebih rendah. Hal ini kemungkinan terjadi karena ketiga senyawa tersebut memiliki aktivitas antibakteri yang rendah dan tidak mampu bekerja secara sinergis sehingga menghasilkan daya hambat yang lebih kecil.

Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5%, di mana pelarut ini merupakan pelarut yang digunakan dalam pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air. Penggunaan DMSO di atas 10% dapat menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri, untuk itu DMSO 5% perlu diikuti sertakan dalam pengujian aktivitas antibakteri. Hasil dari pengujian DMSO 5% tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga daya hambat yang terbentuk benar-benar merupakan aktivitas dari masing-masing fraksi dan ekstrak etanol dari daun kenikir.

10. Pengujian daya antibakteri fraksi teraktif dengan metode dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* ATCC 13311 dilakukan dengan metode dilusi untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan melihat batas terendah tabung media yang jernih atau yang memberikan hasil negatif sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif diinkubasi pada suhu kamar 37⁰C selama 18-24 jam. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

Seri konsentrasi yang digunakan dari fraksi etil asetat daun kenikir yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,562%; 0,781%, kontrol (+) dan kontrol (-). Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian antibiotik kloramfenikol dimulai dari 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,312%; 0,156%; 0,078%; 0,039%, kontrol (+) dan kontrol (-). Perhitungan dan pembuatan konsentrasi fraksi teraktif (fraksi etil asetat) daun kenikir dan antibiotik kloramfenikol metode dilusi dapat dilihat pada lampiran 14 dan 15.

Nilai KHM pada penelitian ini tidak dapat ditentukan karena sampel uji yang digunakan berwarna gelap dan kekeruhannya tinggi sehingga mempersulit

pengamatan. Karena hal tersebut sehingga untuk menentukan nilai KBM dilakukan inokulasi dari tabung pada cawan petri yang berisi medium *Bismuth Sulfit Agar* (BSA) untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan bakteri *S. typhi* ATCC 13311 yang berwarna hitam seperti mata ikan. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun kenikir dan pembanding antibiotik kloramfenikol metode dilusi dapat dilihat pada tabel 10. Foto uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun kenikir dan antibiotik kloramfenikol terhadap *S. typhi* ATCC 13311 metode dilusi dapat dilihat pada lampiran 7 dan 8.

Tabel 9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun kenikir dan pembanding antibiotik kloramfenikol metode dilusi

No	Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat			No	Konsentrasi (%)	Antibiotik kloramfenikol		
		Replikasi					Replikasi		
		I	II	III			I	II	III
1	K (-)	-	-	-	1	K (-)	-	-	-
2	50	-	-	-	2	2,5	-	-	-
3	25	-	-	-	3	1,25	-	-	-
4	12,5	-	-	-	4	0,625	-	-	-
5	6,25	-	-	-	5	0,312	-	-	-
6	3,125	+	+	+	6	0,156	-	-	-
7	1,562	+	+	+	7	0,078	+	+	+
8	0,781	+	+	+	8	0,039	+	+	+
9	K (+)	+	+	+	9	K (+)	+	+	+

Keterangan :

(-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : Ada pertumbuhan bakteri

K (-) : Larutan stok (fraksi etil asetat atau antibiotik kloramfenikol)

K (+) : Suspensi bakteri

Penelitian ini dapat diketahui bahwa nilai KBM fraksi etil asetat yaitu pada konsentrasi 6,25% sedangkan nilai KBM antibiotik kloramfenikol yaitu pada konsentrasi 0,156%. Semakin tinggi konsentrasi larutan uji maka semakin tinggi pula kandungan zat aktif di dalamnya, sehingga aktivitas antibakteri akan semakin besar dan semakin rendah konsentrasi larutan uji maka semakin sedikit kandungan zat aktif di dalamnya sehingga aktivitas antibakteri akan semakin berkurang. Larutan uji yang memiliki konsentrasi bunuh minimum semakin kecil, menandakan semakin potensialnya sediaan tersebut sebagai antibakteri karena dengan konsentrasi kecil larutan uji sudah dapat membunuh bakteri.

Perbandingan konsentrasi fraksi etil asetat sebagai fraksi teraktif dengan antibiotik kloramfenikol sebagai antibakteri menunjukkan hasil yang masih jauh dari yang diharapkan. Kloramfenikol sebagai obat sintetik lebih efektif dalam membunuh pertumbuhan bakteri *S. typhi* ATCC 13311.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

Pertama, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun kenikir mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* ATCC 13311.

Kedua, fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun kenikir memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dalam menghambat *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Ketiga, diameter hambat fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun kenikir terhadap *S. typhi* ATCC 13311 pada konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% berturut-turut yaitu 24,00 mm; 24,67 mm dan 20,00 mm.

Keempat, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun kenikir sebagai antibakteri terhadap *S. typhi* ATCC 13311 yaitu pada konsentrasi 6,25%.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat sebagai antibakteri terhadap *S. typhi* ATCC 13311.

Kedua, perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap daun kenikir dengan menggunakan metode penyarian dan penggunaan pelarut yang berbeda.

Ketiga, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap bakteri patogen lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustrina G. 2011. *Potensi Propolis Lebah Madu (Apis mellifera Spp) Sebagai Bahan Antibakteri*. Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. hlm 1-2, 5-7.
- Alamsyah NA. 2006. *Takhlukkan Penyakit dengan Teh Hijau*. Jakarta: Penerbit Agrimedia Pustaka.
- Batari R. 2007. Identifikasi senyawa flavonoid pada sayuran indigenous Jawa Barat [Skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Chapagain BP, Wiesman Z. 2005. Larvicidal activity of the fruit *mesocarp* extract of *balanites aegyptiaca* and its saponin fractions against *aedes aegypti*. *Dengue Bulletin*. hlm 29.
- Dalimartha S. 2008. *Ensiklopedia Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta: Penebar Swadaya. hlm 431-432.
- [DEPKES RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 3-11.
- [DEPKES RI]. 2005. *Materia Medika Indonesia*. Jilid III. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 301-304.
- [DEPKES RI]. 2006. *Pedoman Pengendalian Demam Tifoid*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dewanti S, Wahyudi TM. 2011. Antibacteri activity of bay leaf infuse (*Folia Syzygium polyanthum Wight*) to *Escherichia coli* in vitro. *J. Med Planta Unair* 1(4): 78-81.
- Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)*. Jilid I. Jakarta: Penebar Swadaya. hlm 106.
- Harborne JB. 2006. *Metode Fitokimia Penuntunan dan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Edisi III. Padmawinata K, penerjemah; Bandung: ITB.
- Hariana A. 2008. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Cetakan kelima. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hariana A. 2013. *262 Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Cetakan pertama. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hassan WE. 2006. *Healing herbs of Malaysia Kuala Lumpur: Federal Land*. Kuala Lumpur: Development Agency.

- Jawetz M, Adelberg's. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Ed-23. Nani W, penerjemah; Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*.
- Jawetz M, Adelberg's. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi XXIV. Bonang G, penerjemah; Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*.
- Jawetz M, Adelberg's. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*. Hartanto H, Rachman C, Dimanti A, Diani A, penerjemah; Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*.
- Jayanegara A, Sofyan A. 2008. Penentuan aktivitas biologis tanin beberapa hijauan secara in vitro dengan polietilenglikos secara determinan. *Jurnal Media Peternakan* 31: 44-52.
- Judd, Campbell, Kellogg, and Stevens. 1999. *Plant Systematics*. USA: Sinauer Associates Inc.
- Juliantina F *et al.* 2008. Manfaat sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai agen anti bakterial terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 60: 58-62.
- Katno, Pramono S. 2008. Tingkat manfaat dan keamanan tanaman obat tradisional [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada Yogyakarta.
- Katzung BG. 2004. *Farmakologi: Dasar dan Klinik*. Edisi Pertama. Jakarta: Salemba Medika. hlm 170.
- Kays SJ. 2011. *Postharvest Physiology of Perishable Plant Product*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Khopkar SM. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM. 1983. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology 2nd ed*. Philadelphia: JB Lippincott Company hlm: 264 - 284.
- List PH, Schmidt PC. 2000. *Phytopharmaceuticals Technology*. David E, penerjemah; Florida: CRC Press. Hal 67. 71. 73. 107-111. Terjemahan dari: *Phytopharmaceuticals Tecnology*.
- Nugraha A, Swacita IBN, Tono KPG. 2012. Deteksi bakteri *Salmonella spp* dan pengujian kualitas telur ayam buras. *Indonesia Medicus Veterinus* 1(3): 320-329.
- Praeparandi. 2006. *Card System Analisa Kimia Farmasi Kualitatif*. Bandung: Seksi Diktat Stenhl. hlm 9.

- Prastowo, Eko A. 2013. *Standarisasi Simplisia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Pratiwi ST. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Penerbit Erlangga. hlm 203-205.
- Putri DN. 2010. Uji aktifitas antibakteri ekstrak metanol daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) terhadap bakteri *S. typhi*. *Journal of Biodiversitas* Volume 8.
- Radji, Biomed. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: ECG. hlm 130-136.
- Ramya BS, Ganesh P. 2012. Phytochemical analysis and comparative effect of *Cinnamomum zeylanicum*, *Piper nigrum* and *Pimpinella anisum* with selected antibiotics and its antibacterial activity against enterobacteriaceae family. India: Departement of Microbiology, Annamalai University, Annamalai Nagar.
- Rasdi NHM, Samah OA, Sule A, Ahmed QU. 2010. Antimicrobial studies of *Cosmos caudatus* Kunth. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(8): 669-673.
- Saepudin, Rihal YS, Suci H. 2007. Perbandingan penggunaan antibiotika pada pengobatan pasien infeksi saluran kemih yang menjalani rawat inap di salah satu RSUD di Yogyakarta tahun 2004 dan 2006. [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas MIPA Jurusan Farmasi, Universitas Islam Indonesia.
- Simpson MG. 2006. *Plant Systematics*. USA: Elsevier Academic Press.
- Sriyanti DP, Wijayani A. 2008. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sudirman S. 2014. Aktivitas antioksidan dan komponen bioaktif kangkung air (*Ipomoea aquatica* Forsk.) [Skripsi]. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Tortora J, Derrickson B. 2007. *Principles of Anatomy and Physiology* ed 13. USA: John Wiley & Sons.
- Waluyo L. 2008. *Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi*. Malang: Universitas Muhammadiyah Press.
- Widyarto. 2009. Uji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* [Skripsi]. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [World Health Organization]. 2013. *Typhoid Counselling Handbook for the Asia-Pacific*. America: World Health Organization.

L

A

M

P

I

R

A

N

Lampiran 1. Surat keterangan hasil determinasi tanaman kenikir



UPT- LABORATORIUM

No : 102/DET/UPT-LAB/13/XI/2016
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Hanifati Eka S
NIM : 19133829 A
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Kenikir**(*Cosmos caudatus* H.B.K.)

Determinasi berdasarkan Steenis: FLORA

1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9b – 10b – 11b – 12b – 13b – 14b – 16b. golongan 11. 286b – 288b – 289b. 121. Familia Compositae. 1b – 12a – 13b – 15a. 14. Cosmos. ***Cosmos caudatus* H.B.K.**

Deskripsi :

Habitus : Herba 1 tahun, kokoh kuat, tegak, sering bercabang banyak, jika diremas aromatis.

Batang : Segiempat, beralur membujur, berambut jarang.

Daun : Berhadapan, tangkai panjang; helaian dari yang rendah menyirip rangkap 3-4 atau berbagi menyirip, 15-25 cm panjang dan lebarnya; daun yang atas berturut-turut bertangkai makin pendek, lebih kecil, kurang berbagi.

Bunga : Bongkol terminal atau di ketiak daun, bertangkai panjang; tangkai berusuk. Daun pembalut 8 yang terluar hijau, kemudian berujung melengkung kembali, 8 yang terdalam dari warna dengan bunga tepinya, tegak; dasar bunga majemuk dengan sisik-sisik jerami. Bunga tepi 8, banci; pinggir memanjang hingga bulat telur terbalik, dengan ujung bergigi 3, merah atau kuning keputihan. Bunga cakram banyak, berkelamin 2; mahkota tinggi 1 cm, bertaju 5, pucat dengan ujung kuning. Tabung kepala sari coklat kehitaman. Cabang tangkai putik 2, runcing, bagian luar berambut panjang.

Buah : Keras, bentuk spul sempit, beralur, coklat kehitaman, berparuh; paruh 1-1,5 cm panjangnya, menjadi lebih pendek jika berasal dari bunga yang makin keluar letaknya, pada ujung dengan tombol pucat, yang berambut sikat langsing 2-3.

Biji : Bentuk jarum, kecil, hitam, lk 1 cm.

Akar : Tunggang.

Pustaka : Steenis C.G.G.J., Bloembergen S. Eyma P.J. (1978); *FLORA*, PT Pradnya Paramita. Jl. Kebon Sirih 46. Jakarta Pusat, 1978.



Surakarta, 13 November 2016

Tim determinasi

Dra. Kartimah Wiryosoendjojo, SU.

Lampiran 2. Gambar daun kenikir dan serbuk daun kenikir



Daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.)



Serbuk daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.)

Lampiran 3. Gambar alat *Sterling-bidwell*, vortex, inkubator, autoclav, evaporator, uji bebas etanol



Sterling-bidwell



Vortex



Inkubator



Autoclav



Evaporator



Uji bebas etanol

Lampiran 4. Gambar ekstrak etanol, proses dan hasil fraksinasi daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.)



Ekstrak etanol

**Proses
fraksinasi *n*-heksana**



**Hasil
fraksi *n*-heksana**



**Proses
fraksinasi etil asetat**



**Hasil
fraksi etil asetat**























**Proses
fraksinasi air**



**Hasil
fraksi air**

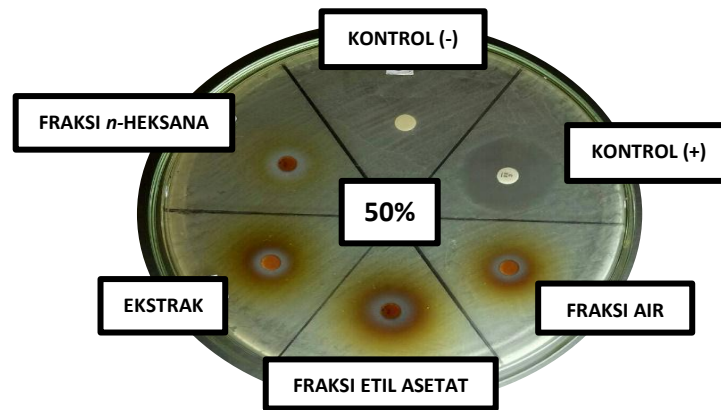


Lampiran 5. Gambar pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun kenikir

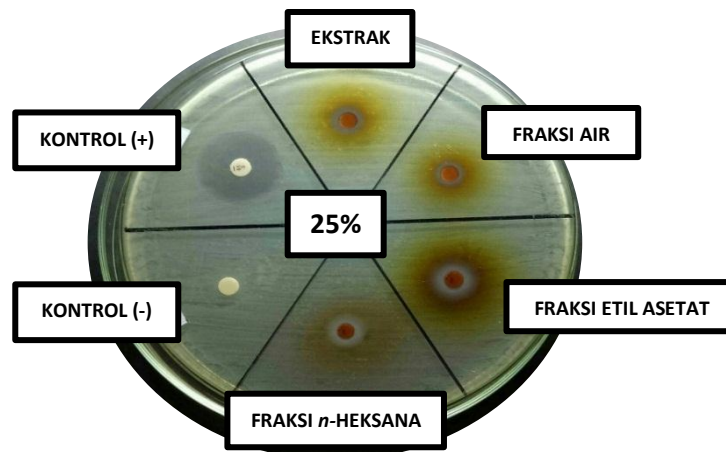
Senyawa	Bahan uji				
	Serbuk	Ekstrak	Fraksi n-heksana	Fraksi etil asetat	Fraksi air
Flavonoid					
Saponin					
Alkaloid					
Tanin					

Lampiran 6. Gambar uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun kenikir terhadap *S. typhi* ATCC 13311 metode difusi

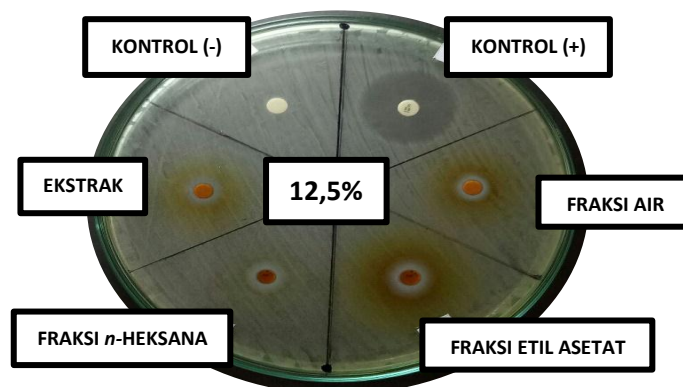
Replikasi 1:



Konsentrasi 50%

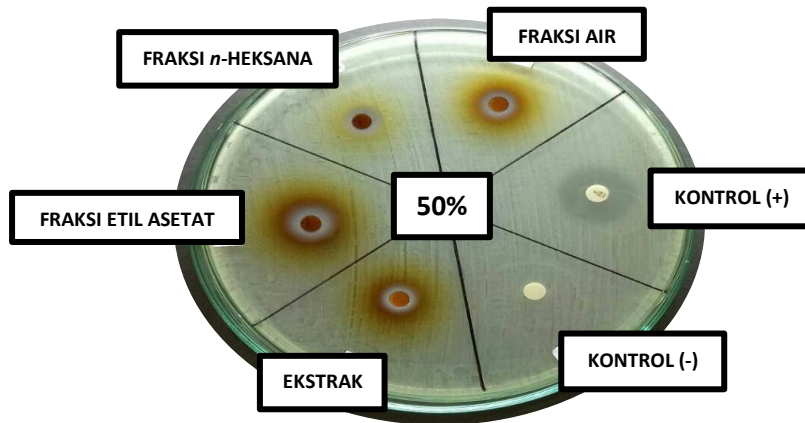


Konsentrasi 25%

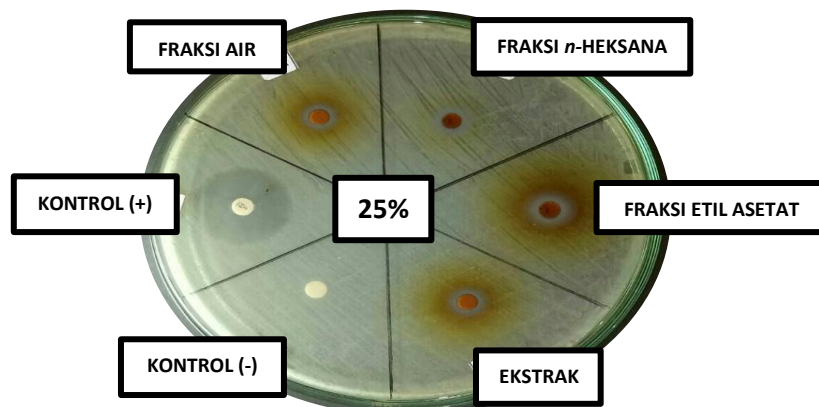


Konsentrasi 12,5%

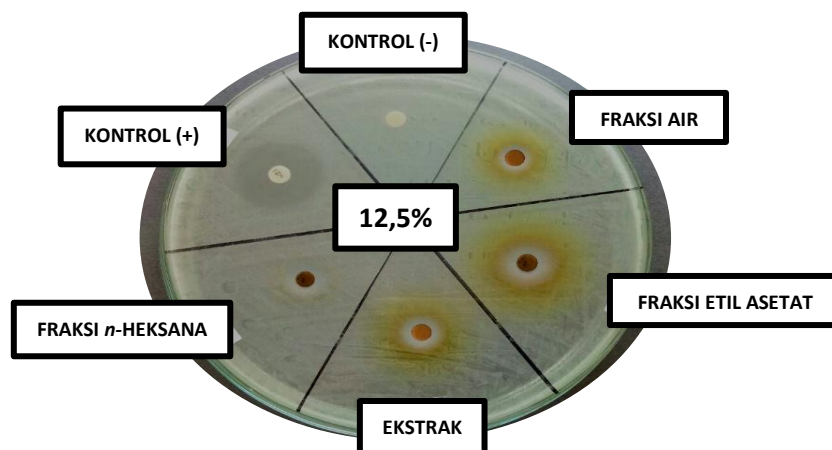
Replikasi 2 :



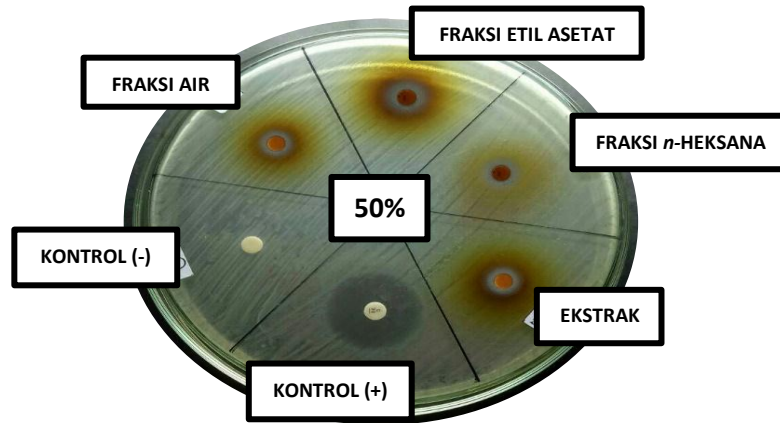
Konsentrasi 50%



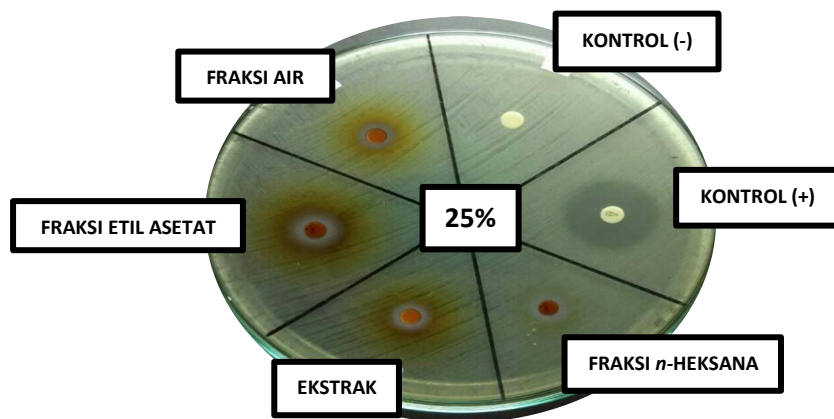
Konsentrasi 25%



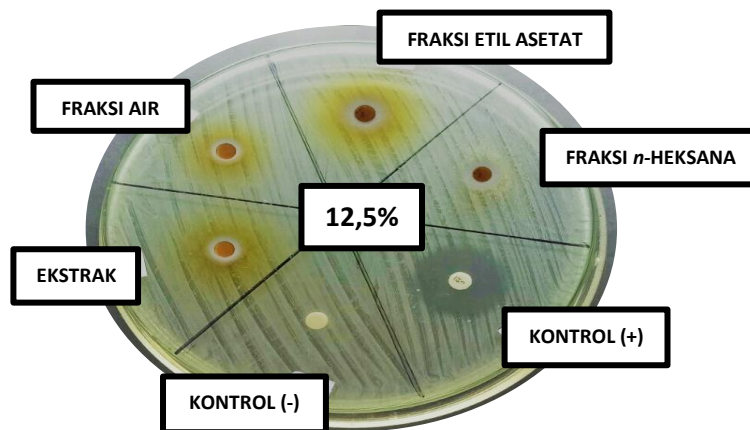
Konsentrasi 12,5%

Replikasi 3 :

Konsentrasi 50%



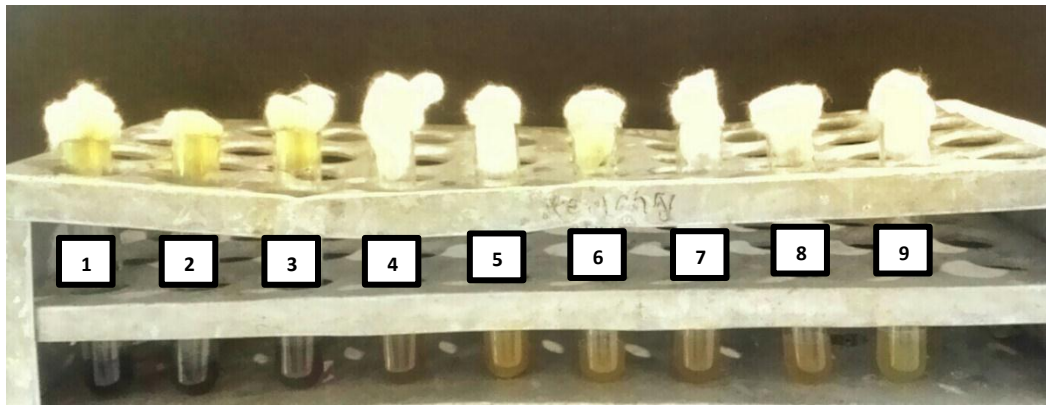
Konsentrasi 25%



Konsentrasi 12,5%

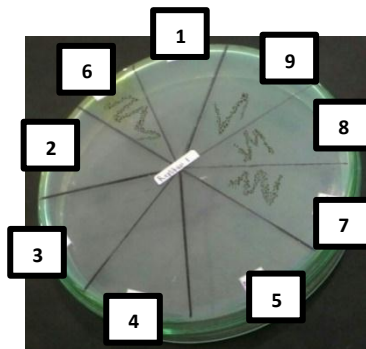
Lampiran 7. Gambar uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun kenikir terhadap *S. typhi* ATCC 13311 metode dilusi

Uji dilusi fraksi etil asetat daun kenikir

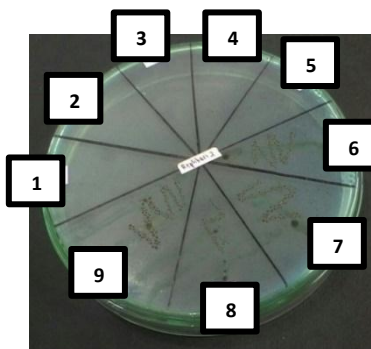


Hasil inokulasi fraksi etil asetat daun kenikir

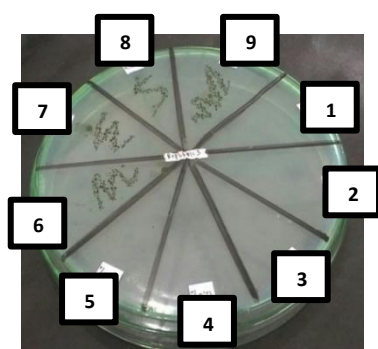
Replikasi 1 :



Replikasi 2 :



Replikasi 3 :

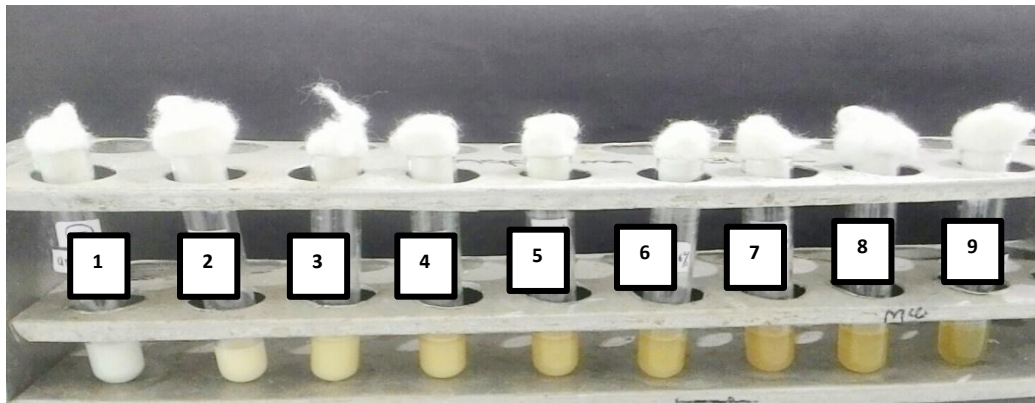


Keterangan :

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| 1. kontrol (-) | 6. konsentrasi 3,125% |
| 2. konsentrasi 50% | 7. konsentrasi 1,562% |
| 3. konsentrasi 25% | 8. konsentrasi 0,781% |
| 4. konsentrasi 12,5% | 9. kontrol (+) |
| 5. konsentrasi 6,25% | |

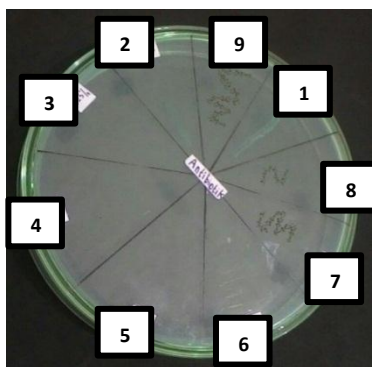
Lampiran 8. Gambar uji aktivitas antibakteri antibiotik kloramfenikol terhadap *S. typhi* ATCC 13311 metode dilusi

Uji dilusi antibiotik kloramfenikol

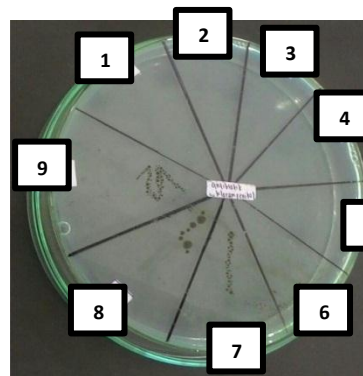


Hasil inokulasi antibiotik kloramfenikol

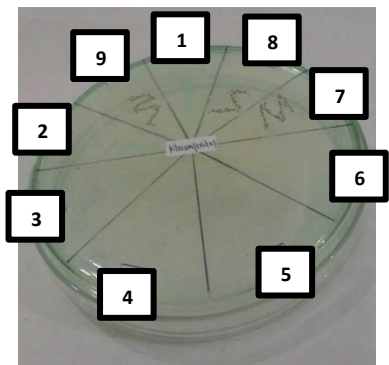
Replikasi 1 :



Replikasi 2 :



Replikasi 3 :



Keterangan :

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| 1. kontrol (-) | 6. konsentrasi 0,156% |
| 2. konsentrasi 2,5% | 7. konsentrasi 0,078% |
| 3. konsentrasi 1,25% | 8. konsentrasi 0,039% |
| 4. konsentrasi 0,625% | 9. kontrol (+) |
| 5. konsentrasi 0,312% | |

Lampiran 9. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun kenikir

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
10000	2350	23,5

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{bobot kering (g)}}{\text{bobot basah (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{2350}{10000} \times 100\% \\ &= 23,5\% \end{aligned}$$

Lampiran 10. Perhitungan persentase penetapan kadar air serbuk daun kenikir

No	Bobot serbuk (gram)	Volume air (ml)	Kadar air (%)
1	20	1,6	8,0
2	20	1,5	7,5
3	20	1,6	8,0
Rata-rata			7,83

$$\text{Perhitungan persentase penetapan kadar air} = \frac{\text{volume air (ml)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar air I} = \frac{1,6}{20} \times 100\%$$

$$= 8,00\%$$

$$\text{Kadar air II} = \frac{1,5}{20} \times 100\%$$

$$= 7,5\%$$

$$\text{Kadar air III} = \frac{1,6}{20} \times 100\%$$

$$= 8,0\%$$

$$\text{Rata-rata prosentase kadar air} = \frac{8,0\% + 7,5\% + 8,0\%}{3} = 7,83\%$$

Lampiran 11. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol daun kenikir

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
900	197,9	21,9

$$\begin{aligned}\text{Rendemen ekstrak etanol} &= \frac{\text{bobot ekstrak kental (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{197,9}{900} \times 100\% \\ &= 21,9\%\end{aligned}$$

Lampiran 12. Perhitungan persen rendemen fraksinasi daun kenikir

Ekstrak etanol (gram)	Pelarut	Hasil fraksi (gram)	Rendemen (%)
90	<i>n</i> -heksana	10,11	11,23
	Etil asetat	21,18	23,53
	Air	39,97	44,41

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

1. Fraksi *n*-heksana

- % Rendemen fraksi = $\frac{10,11}{90} \times 100\%$
= 11,23%

2. Fraksi etil asetat

- % Rendemen fraksi = $\frac{21,18}{90} \times 100\%$
= 23,53%

3. Fraksi air

- % Rendemen fraksi = $\frac{39,97}{90} \times 100\%$
= 44,41%

Lampiran 13. Perhitungan dan pembuatan konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi daun kenikir metode difusi

Larutan stok 50% : 50 % ^b/_v = 50 gram/100 ml

Konsentrasi 50% : 2 gram/4ml

Menimbang 2 gram ekstrak atau fraksi, kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% sampai 4ml

Konsentrasi 25% : $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$

$$V_1 \cdot 50\% = 2\text{ml} \cdot 25\%$$

$$V_1 = \frac{2\text{ ml} \cdot 25\%}{50\%}$$

$$V_1 = 1\text{ml}$$

Diambil 1ml dari sediaan awal (50%), kemudian ditambah DMSO 5% sampai 2ml

Konsentrasi 12,5% : $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$

$$V_1 \cdot 25\% = 2\text{ml} \cdot 12,5\%$$

$$V_1 = \frac{2\text{ ml} \cdot 12,5\%}{50\%}$$

$$V_1 = 1\text{ml}$$

Diambil 1ml dari sediaan kedua (25%), kemudian ditambah DMSO 5% sampai 2ml

**Lampiran 14. Perhitungan dan pembuatan konsentrasi fraksi teraktif
(fraksi etil asetat) daun kenikir metode dilusi**

Fraksi etil asetat 50% = 50% b/v = 50 mg/100ml = 1 gram/2ml

Menimbang 1 gram fraksi etil asetat, kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% sampai 2ml

Tabung 1 = kontrol (-) diisi fraksi etil asetat 1ml konsentrasi 50%

Tabung 2 = 1ml fraksi etil asetat konsentrasi 50%

Tabung 3 = pembuatan konsentrasi 25%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 50\% &= 1\text{ml} \cdot 25\% \\ V_1 &= \frac{1\text{ml} \cdot 25\%}{50\%} \\ V_1 &= 0,5\text{ml} \end{aligned}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 2 kemudian ditambah BHI sampai 1ml

Tabung 4 = pembuatan konsentrasi 12,5%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 25\% &= 1\text{ml} \cdot 12,5\% \\ V_1 &= \frac{1\text{ml} \cdot 12,5\%}{25\%} \\ V_1 &= 0,5\text{ml} \end{aligned}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 3 kemudian ditambah BHI sampai 1ml

Tabung 5 = pembuatan konsentrasi 6,25%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 12,5\% &= 1\text{ml} \cdot 6,25\% \\ V_1 &= \frac{1\text{ml} \cdot 6,25\%}{12,5\%} \end{aligned}$$

$$V_1 = 0,5\text{ml}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 4 kemudian ditambah BHI sampai 1ml

Tabung 6 = pembuatan konsentrasi 3,125%

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 6,25\% = 1\text{ml} \cdot 3,125\%$$

$$V_1 = \frac{1 \text{ ml} \cdot 3,125\%}{6,25\%}$$

$$V_1 = 0,5\text{ml}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 5 kemudian ditambah BHI sampai 1ml

Tabung 7 = pembuatan konsentrasi 1,562%

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 3,125\% = 1\text{ml} \cdot 1,562\%$$

$$V_1 = \frac{1 \text{ ml} \cdot 1,562\%}{3,125\%}$$

$$V_1 = 0,5\text{ml}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 6 kemudian ditambah BHI sampai 1ml

Tabung 8 = pembuatan konsentrasi 0,781%

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 1,562\% = 1\text{ml} \cdot 0,781\%$$

$$V_1 = \frac{1 \text{ ml} \cdot 0,781\%}{1,562\%}$$

$$V_1 = 0,5\text{ml}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 7 kemudian ditambah BHI sampai 1ml, kemudian Diambil 0,5ml dan dibuang

Tabung 9 = kontrol (+) diisi suspensi bakteri 1ml

Keterangan :

Tabung 2 sampai 8 ditambahkan suspensi bakteri 0,5 ml

**Lampiran 15. Perhitungan dan pembuatan konsentrasi antibiotik
kloramfenikol metode dilusi**

$$\text{Dosis kloramfenikol} = \frac{125 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} = \frac{2500 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{2,5 \text{ g}}{100 \text{ ml}} = 2,5 \%$$

Tabung 1 = kontrol (-) diisi antibiotik kloramfenikol 1ml konsentrasi 2,5%

Tabung 2 = 1ml antibiotik kloramfenikol konsentrasi 2,5%

Tabung 3 = pembuatan konsentrasi 1,25%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ 0,5 \cdot 2,5\% &= V_2 \cdot 1,25\% \\ V_2 &= \frac{0,5 \text{ ml} \cdot 2,5\%}{1,25\%} \\ V_1 &= 1 \text{ ml} \end{aligned}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 2 kemudian ditambah BHI sampai 1ml

Tabung 4 = pembuatan konsentrasi 0,625%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ 0,5 \cdot 1,25\% &= V_2 \cdot 0,625\% \\ V_2 &= \frac{0,5 \text{ ml} \cdot 1,25\%}{0,625\%} \\ V_1 &= 1 \text{ ml} \end{aligned}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 3 kemudian ditambah BHI sampai 1ml

Tabung 5 = pembuatan konsentrasi 0,312%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ 0,5 \cdot 0,625\% &= V_2 \cdot 0,312\% \\ V_2 &= \frac{0,5 \text{ ml} \cdot 0,625\%}{0,3125\%} \end{aligned}$$

$$V_1 = 1\text{ml}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 4 kemudian ditambah BHI sampai 1ml

Tabung 6 = pembuatan konsentrasi 0,156%

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,312\% = V_2 \cdot 0,156\%$$

$$V_2 = \frac{0,5 \text{ ml} \cdot 0,312\%}{0,156\%}$$

$$V_1 = 1\text{ml}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 5 kemudian ditambah BHI sampai 1ml

Tabung 7 = pembuatan konsentrasi 0,078%

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,156\% = V_2 \cdot 0,078\%$$

$$V_2 = \frac{0,5 \text{ ml} \cdot 0,156\%}{0,078\%}$$

$$V_1 = 1\text{ml}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 6 kemudian ditambah BHI sampai 1ml

Tabung 8 = pembuatan konsentrasi 0,039%

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,078\% = V_2 \cdot 0,039\%$$

$$V_2 = \frac{0,5 \text{ ml} \cdot 0,078\%}{0,039\%}$$

$$V_1 = 1\text{ml}$$

Diambil 0,5ml dari dari tabung 7 kemudian ditambah BHI sampai 1ml, kemudian Diambil 0,5ml dan dibuang

Tabung 9 = kontrol (+) diisi suspensi bakteri 1ml

Keterangan :

Tabung 2 sampai 8 ditambahkan suspensi bakteri 0,5 ml

Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media

1. Formulasi dan pembuatan *Bismuth Sulfite Agar* (BSA)

Enzimatic Digest of Casein.....	5,0 gram
Enzimatis Intisari dari Jaringan Hewan.....	5,0 gram
Beef Extract	5,0 gram
Dextrose	5,0 gram
Disodium fosfat hydrogenphospate.....	4,0 gram
Ferrous Sulfat	0,3 gram
Bismuth Sulfite Indikator.....	8,0 gram
Brilliant green	0,025 gram
Agar	15,0 gram

Suspensikan 47,5 gram bahan di atas dalam aquadest sebanyak 1000 ml, panaskan sampai larut sempurna, kemudian media diukur pH 7,4. Masukkan ke dalam cawan petri. Media BSA tidak di autoklaf.

2. Formulasi dan pembuatan *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Beef, dehydrated infusion	300 gram
Casien hydrolysate	17,5 gram
Strach	1,5 gram
Agar	17 gram

Suspensikan 38 gram bahan di atas dalam aquadest sebanyak 1000 ml, panaskan sampai larut sempurna, disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian media diukur pH 7,4 dan masukkan ke dalam cawan petri.

3. 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

Suspensikan 37 gram bahan di atas dalam aquadest sebanyak 1000 ml, panaskan sampai larut sempurna, disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian diukur media pH 7,4 dan dituangkan dalam tabung.

4. Formulasi dan pembuatan *Sulfide Indol Motility* (SIM)

Pepton from casein	12,5 gram
Pepton from meat	5 gram
Ammonium Iron (II) Sitrat	10 gram
Sodium thiosulfate	0,2 gram
Agar	0,2 gram

Suspensikan 30 gram bahan di atas dalam aquadest sebanyak 1000 ml, panaskan sampai larut sempurna, disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian media diukur pH 7,4 dan dituangkan dalam tabung.

5. Formulasi dan pembuatan *Klinger Iron Agar* (KIA)

Pepton from casein	15 gram
Pepton from meat	5 gram
Ammonium Iron (II) Sitrat	0,5 gram
Meat extract	3 gram
Yeast extract	3 gram
Sodium chloride	0,2 gram
Laktosa	0,2 gram
Glukosa.....	1 gram
Sodium thiosulfate	0,5 gram
Phenol red	0,024 gram
Agar	12 gram

Suspensikan 55 gram bahan di atas dalam aquadest sebanyak 1000 ml, panaskan sampai larut sempurna, disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian media diukur pH 7,4 dan dituangkan dalam tabung.

6. Formulasi dan pembuatan *Lysine Iron Agar* (LIA)

Pepton from casein	5 gram
Yeast extract	3 gram
Glukosa.....	1 gram

Lysine monohydrochloride	10 gram
Sodium thiosulfate.....	0,04 gram
Ammonium Iron (II) Sitrat	0,5 gram
Bromo cresol purple	0,02 gram
Agar	0,2 gram

Suspensikan 32 gram bahan di atas dalam aquadest sebanyak 1000 ml, panaskan sampai larut sempurna, disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian media diukur pH 7,4 dan dituangkan dalam tabung.

7. Formulasi dan pembuatan *Citrat Agar*

Ammonium hydrogen fosfat	1 gram
Di-sodium hydrogen phosphate	3 gram
Sodium chloride	5 gram
Magnesium sulfat	0,2 gram
Bromo thymol blue.....	0,08 gram
Agar	12,5 gram

Suspensikan 23 gram bahan di atas dalam aquadest sebanyak 1000 ml, panaskan sampai larut sempurna, disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian media diukur pH 7,4 dan dituangkan dalam tabung.

Lampiran 17. Analisa data uji ANOVA antara ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dengan konsentrasi 50%; 25% dan 12,5% serta kontrol (+) dan kontrol (-) terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
diameter hambatan (mm)	42	17,1667	6,78922	,00	30,00

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		diameter hambatan (mm)
N		42
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	17,1667
	Std. Deviation	6,78922
	Absolute	,128
Most Extreme Differences	Positive	,124
	Negative	-,128
Kolmogorov-Smirnov Z		,830
Asymp. Sig. (2-tailed)		,496

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

diameter hambatan (mm)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ekstrak 50%	3	18,0000	1,00000	,57735	15,5159	20,4841	17,00	19,00
ekstrak 25%	3	19,3333	,57735	,33333	17,8991	20,7676	19,00	20,00
ekstrak 12,5%	3	15,3333	1,15470	,66667	12,4649	18,2018	14,00	16,00
fraksi n-heksana 50%	3	13,3333	1,52753	,88192	9,5388	17,1279	12,00	15,00
fraksi n-heksana 25%	3	16,3333	1,52753	,88192	12,5388	20,1279	15,00	18,00
fraksi n-heksana 12,5%	3	11,6667	1,52753	,88192	7,8721	15,4612	10,00	13,00
fraksi etil asetat 50%	3	24,0000	1,00000	,57735	21,5159	26,4841	23,00	25,00
fraksi etil asetat 25%	3	24,6667	,57735	,33333	23,2324	26,1009	24,00	25,00
fraksi etil asetat 12,5%	3	20,0000	,00000	,00000	20,0000	20,0000	20,00	20,00
fraksi air 50%	3	16,3333	1,52753	,88192	12,5388	20,1279	15,00	18,00
fraksi air 25%	3	18,0000	1,00000	,57735	15,5159	20,4841	17,00	19,00
fraksi air 12,5%	3	14,0000	1,00000	,57735	11,5159	16,4841	13,00	15,00
kloramfenikol	3	29,3333	,57735	,33333	27,8991	30,7676	29,00	30,00
DMSO 5%	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
Total	42	17,1667	6,78922	1,04760	15,0510	19,2823	,00	30,00

Test of Homogeneity of Variances

diameter hambatan (mm)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,723	13	28	,111

ANOVA

diameter hambatan (mm)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1858,500	13	142,962	127,753	,000
Within Groups	31,333	28	1,119		
Total	1889,833	41			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: diameter hambatan (mm)

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak 50%	ekstrak 25%	-1,33333	,86373	,947	-4,4949	1,8283
	ekstrak 12,5%	2,66667	,86373	,167	-,4949	5,8283
	fraksi n-heksana 50%	4,66667*	,86373	,001	1,5051	7,8283
	fraksi n-heksana 25%	1,66667	,86373	,794	-1,4949	4,8283
	fraksi n-heksana 12,5%	6,33333*	,86373	,000	3,1717	9,4949
	fraksi etil asetat 50%	-6,00000*	,86373	,000	-9,1616	-2,8384
	fraksi etil asetat 25%	-6,66667*	,86373	,000	-9,8283	-3,5051
	fraksi etil asetat 12,5%	-2,00000	,86373	,558	-5,1616	1,1616
	fraksi air 50%	1,66667	,86373	,794	-1,4949	4,8283
	fraksi air 25%	,00000	,86373	1,000	-3,1616	3,1616
	fraksi air 12,5%	4,00000*	,86373	,005	,8384	7,1616
	kloramfenikol	-11,33333*	,86373	,000	-14,4949	-8,1717
	DMSO 5%	18,00000*	,86373	,000	14,8384	21,1616
	ekstrak 25%	ekstrak 50%	1,33333	,86373	,947	-1,8283
ekstrak 12,5%		4,00000*	,86373	,005	,8384	7,1616
fraksi n-heksana 50%		6,00000*	,86373	,000	2,8384	9,1616
fraksi n-heksana 25%		3,00000	,86373	,076	-,1616	6,1616
fraksi n-heksana 12,5%		7,66667*	,86373	,000	4,5051	10,8283
fraksi etil asetat 50%		-4,66667*	,86373	,001	-7,8283	-1,5051
fraksi etil asetat 25%		-5,33333*	,86373	,000	-8,4949	-2,1717
fraksi etil asetat 12,5%		-,66667	,86373	1,000	-3,8283	2,4949
fraksi air 50%		3,00000	,86373	,076	-,1616	6,1616
fraksi air 25%		1,33333	,86373	,947	-1,8283	4,4949
fraksi air 12,5%		5,33333*	,86373	,000	2,1717	8,4949
kloramfenikol		-10,00000*	,86373	,000	-13,1616	-6,8384
DMSO 5%		19,33333*	,86373	,000	16,1717	22,4949
ekstrak 12,5%		ekstrak 50%	-2,66667	,86373	,167	-5,8283
	ekstrak 25%	-4,00000*	,86373	,005	-7,1616	-,8384
	fraksi n-heksana 50%	2,00000	,86373	,558	-1,1616	5,1616
	fraksi n-heksana 25%	-1,00000	,86373	,995	-4,1616	2,1616
	fraksi n-heksana 12,5%	3,66667*	,86373	,012	,5051	6,8283
	fraksi etil asetat 50%	-8,66667*	,86373	,000	-11,8283	-5,5051
	fraksi etil asetat 25%	-9,33333*	,86373	,000	-12,4949	-6,1717
	fraksi etil asetat 12,5%	-4,66667*	,86373	,001	-7,8283	-1,5051
	fraksi air 50%	-1,00000	,86373	,995	-4,1616	2,1616
	fraksi air 25%	-2,66667	,86373	,167	-5,8283	,4949
	fraksi air 12,5%	1,33333	,86373	,947	-1,8283	4,4949
	kloramfenikol	-14,00000*	,86373	,000	-17,1616	-10,8384
	DMSO 5%	15,33333*	,86373	,000	12,1717	18,4949
	fraksi n-heksana 50%	ekstrak 50%	-4,66667*	,86373	,001	-7,8283
ekstrak 25%		-6,00000*	,86373	,000	-9,1616	-2,8384
ekstrak 12,5%		-2,00000	,86373	,558	-5,1616	1,1616
fraksi n-heksana 25%		-3,00000	,86373	,076	-6,1616	,1616
fraksi n-heksana 12,5%		1,66667	,86373	,794	-1,4949	4,8283
fraksi etil asetat 50%		-10,66667*	,86373	,000	-13,8283	-7,5051
fraksi etil asetat 25%		-11,33333*	,86373	,000	-14,4949	-8,1717
fraksi etil asetat 12,5%		-6,66667*	,86373	,000	-9,8283	-3,5051
fraksi air 50%		-3,00000	,86373	,076	-6,1616	,1616
fraksi air 25%		-4,66667*	,86373	,001	-7,8283	-1,5051
fraksi air 12,5%	-,66667	,86373	1,000	-3,8283	2,4949	

	kloramfenikol	-16,00000*	,86373	,000	-19,1616	-12,8384
	DMSO 5%	13,33333*	,86373	,000	10,1717	16,4949
	ekstrak 50%	-1,66667	,86373	,794	-4,8283	1,4949
	ekstrak 25%	-3,00000	,86373	,076	-6,1616	,1616
	ekstrak 12,5%	1,00000	,86373	,995	-2,1616	4,1616
	fraksi n-heksana 50%	3,00000	,86373	,076	-,1616	6,1616
	fraksi n-heksana 12,5%	4,66667*	,86373	,001	1,5051	7,8283
fraksi n-heksana	fraksi etil asetat 50%	-7,66667*	,86373	,000	-10,8283	-4,5051
25%	fraksi etil asetat 25%	-8,33333*	,86373	,000	-11,4949	-5,1717
	fraksi etil asetat 12,5%	-3,66667*	,86373	,012	-6,8283	-,5051
	fraksi air 50%	,00000	,86373	1,000	-3,1616	3,1616
	fraksi air 25%	-1,66667	,86373	,794	-4,8283	1,4949
	fraksi air 12,5%	2,33333	,86373	,328	-,8283	5,4949
	kloramfenikol	-13,00000*	,86373	,000	-16,1616	-9,8384
	DMSO 5%	16,33333*	,86373	,000	13,1717	19,4949
	ekstrak 50%	-6,33333*	,86373	,000	-9,4949	-3,1717
	ekstrak 25%	-7,66667*	,86373	,000	-10,8283	-4,5051
	ekstrak 12,5%	-3,66667*	,86373	,012	-6,8283	-,5051
	fraksi n-heksana 50%	-1,66667	,86373	,794	-4,8283	1,4949
	fraksi n-heksana 25%	-4,66667*	,86373	,001	-7,8283	-1,5051
fraksi n-heksana	fraksi etil asetat 50%	-12,33333*	,86373	,000	-15,4949	-9,1717
12,5%	fraksi etil asetat 25%	-13,00000*	,86373	,000	-16,1616	-9,8384
	fraksi etil asetat 12,5%	-8,33333*	,86373	,000	-11,4949	-5,1717
	fraksi air 50%	-4,66667*	,86373	,001	-7,8283	-1,5051
	fraksi air 25%	-6,33333*	,86373	,000	-9,4949	-3,1717
	fraksi air 12,5%	-2,33333	,86373	,328	-5,4949	,8283
	kloramfenikol	-17,66667*	,86373	,000	-20,8283	-14,5051
	DMSO 5%	11,66667*	,86373	,000	8,5051	14,8283
	ekstrak 50%	6,00000*	,86373	,000	2,8384	9,1616
	ekstrak 25%	4,66667*	,86373	,001	1,5051	7,8283
	ekstrak 12,5%	8,66667*	,86373	,000	5,5051	11,8283
	fraksi n-heksana 50%	10,66667*	,86373	,000	7,5051	13,8283
	fraksi n-heksana 25%	7,66667*	,86373	,000	4,5051	10,8283
fraksi etil asetat	fraksi n-heksana 12,5%	12,33333*	,86373	,000	9,1717	15,4949
50%	fraksi etil asetat 25%	-,66667	,86373	1,000	-3,8283	2,4949
	fraksi etil asetat 12,5%	4,00000*	,86373	,005	,8384	7,1616
	fraksi air 50%	7,66667*	,86373	,000	4,5051	10,8283
	fraksi air 25%	6,00000*	,86373	,000	2,8384	9,1616
	fraksi air 12,5%	10,00000*	,86373	,000	6,8384	13,1616
	kloramfenikol	-5,33333*	,86373	,000	-8,4949	-2,1717
	DMSO 5%	24,00000*	,86373	,000	20,8384	27,1616
	ekstrak 50%	6,66667*	,86373	,000	3,5051	9,8283
	ekstrak 25%	5,33333*	,86373	,000	2,1717	8,4949
	ekstrak 12,5%	9,33333*	,86373	,000	6,1717	12,4949
	fraksi n-heksana 50%	11,33333*	,86373	,000	8,1717	14,4949
	fraksi n-heksana 25%	8,33333*	,86373	,000	5,1717	11,4949
fraksi etil asetat	fraksi n-heksana 12,5%	13,00000*	,86373	,000	9,8384	16,1616
25%	fraksi etil asetat 50%	,66667	,86373	1,000	-2,4949	3,8283
	fraksi etil asetat 12,5%	4,66667*	,86373	,001	1,5051	7,8283
	fraksi air 50%	8,33333*	,86373	,000	5,1717	11,4949
	fraksi air 25%	6,66667*	,86373	,000	3,5051	9,8283
	fraksi air 12,5%	10,66667*	,86373	,000	7,5051	13,8283
	kloramfenikol	-4,66667*	,86373	,001	-7,8283	-1,5051
	DMSO 5%	24,66667*	,86373	,000	21,5051	27,8283
	ekstrak 50%	2,00000	,86373	,558	-1,1616	5,1616
	ekstrak 25%	,66667	,86373	1,000	-2,4949	3,8283
	ekstrak 12,5%	4,66667*	,86373	,001	1,5051	7,8283
fraksi etil asetat	fraksi n-heksana 50%	6,66667*	,86373	,000	3,5051	9,8283
12,5%	fraksi n-heksana 25%	3,66667*	,86373	,012	,5051	6,8283
	fraksi n-heksana 12,5%	8,33333*	,86373	,000	5,1717	11,4949
	fraksi etil asetat 50%	-4,00000*	,86373	,005	-7,1616	-,8384
	fraksi etil asetat 25%	-4,66667*	,86373	,001	-7,8283	-1,5051

	fraksi air 50%	3,66667*	,86373	,012	,5051	6,8283
	fraksi air 25%	2,00000	,86373	,558	-1,1616	5,1616
	fraksi air 12,5%	6,00000*	,86373	,000	2,8384	9,1616
	kloramfenikol	-9,33333*	,86373	,000	-12,4949	-6,1717
	DMSO 5%	20,00000*	,86373	,000	16,8384	23,1616
	ekstrak 50%	-1,66667	,86373	,794	-4,8283	1,4949
	ekstrak 25%	-3,00000	,86373	,076	-6,1616	,1616
	ekstrak 12,5%	1,00000	,86373	,995	-2,1616	4,1616
	fraksi n-heksana 50%	3,00000	,86373	,076	-,1616	6,1616
	fraksi n-heksana 25%	,00000	,86373	1,000	-3,1616	3,1616
	fraksi n-heksana 12,5%	4,66667*	,86373	,001	1,5051	7,8283
fraksi air 50%	fraksi etil asetat 50%	-7,66667*	,86373	,000	-10,8283	-4,5051
	fraksi etil asetat 25%	-8,33333*	,86373	,000	-11,4949	-5,1717
	fraksi etil asetat 12,5%	-3,66667*	,86373	,012	-6,8283	-,5051
	fraksi air 25%	-1,66667	,86373	,794	-4,8283	1,4949
	fraksi air 12,5%	2,33333	,86373	,328	-,8283	5,4949
	kloramfenikol	-13,00000*	,86373	,000	-16,1616	-9,8384
	DMSO 5%	16,33333*	,86373	,000	13,1717	19,4949
	ekstrak 50%	,00000	,86373	1,000	-3,1616	3,1616
	ekstrak 25%	-1,33333	,86373	,947	-4,4949	1,8283
	ekstrak 12,5%	2,66667	,86373	,167	-,4949	5,8283
	fraksi n-heksana 50%	4,66667*	,86373	,001	1,5051	7,8283
	fraksi n-heksana 25%	1,66667	,86373	,794	-1,4949	4,8283
	fraksi n-heksana 12,5%	6,33333*	,86373	,000	3,1717	9,4949
fraksi air 25%	fraksi etil asetat 50%	-6,00000*	,86373	,000	-9,1616	-2,8384
	fraksi etil asetat 25%	-6,66667*	,86373	,000	-9,8283	-3,5051
	fraksi etil asetat 12,5%	-2,00000	,86373	,558	-5,1616	1,1616
	fraksi air 50%	1,66667	,86373	,794	-1,4949	4,8283
	fraksi air 12,5%	4,00000*	,86373	,005	,8384	7,1616
	kloramfenikol	-11,33333*	,86373	,000	-14,4949	-8,1717
	DMSO 5%	18,00000*	,86373	,000	14,8384	21,1616
	ekstrak 50%	-4,00000*	,86373	,005	-7,1616	-,8384
	ekstrak 25%	-5,33333*	,86373	,000	-8,4949	-2,1717
	ekstrak 12,5%	-1,33333	,86373	,947	-4,4949	1,8283
	fraksi n-heksana 50%	,66667	,86373	1,000	-2,4949	3,8283
	fraksi n-heksana 25%	-2,33333	,86373	,328	-5,4949	,8283
	fraksi n-heksana 12,5%	2,33333	,86373	,328	-,8283	5,4949
fraksi air 12,5%	fraksi etil asetat 50%	-10,00000*	,86373	,000	-13,1616	-6,8384
	fraksi etil asetat 25%	-10,66667*	,86373	,000	-13,8283	-7,5051
	fraksi etil asetat 12,5%	-6,00000*	,86373	,000	-9,1616	-2,8384
	fraksi air 50%	-2,33333	,86373	,328	-5,4949	,8283
	fraksi air 25%	-4,00000*	,86373	,005	-7,1616	-,8384
	kloramfenikol	-15,33333*	,86373	,000	-18,4949	-12,1717
	DMSO 5%	14,00000*	,86373	,000	10,8384	17,1616
	ekstrak 50%	11,33333*	,86373	,000	8,1717	14,4949
	ekstrak 25%	10,00000*	,86373	,000	6,8384	13,1616
	ekstrak 12,5%	14,00000*	,86373	,000	10,8384	17,1616
	fraksi n-heksana 50%	16,00000*	,86373	,000	12,8384	19,1616
	fraksi n-heksana 25%	13,00000*	,86373	,000	9,8384	16,1616
	fraksi n-heksana 12,5%	17,66667*	,86373	,000	14,5051	20,8283
kloramfenikol	fraksi etil asetat 50%	5,33333*	,86373	,000	2,1717	8,4949
	fraksi etil asetat 25%	4,66667*	,86373	,001	1,5051	7,8283
	fraksi etil asetat 12,5%	9,33333*	,86373	,000	6,1717	12,4949
	fraksi air 50%	13,00000*	,86373	,000	9,8384	16,1616
	fraksi air 25%	11,33333*	,86373	,000	8,1717	14,4949
	fraksi air 12,5%	15,33333*	,86373	,000	12,1717	18,4949
	DMSO 5%	29,33333*	,86373	,000	26,1717	32,4949
	ekstrak 50%	-18,00000*	,86373	,000	-21,1616	-14,8384
DMSO 5%	ekstrak 25%	-19,33333*	,86373	,000	-22,4949	-16,1717
	ekstrak 12,5%	-15,33333*	,86373	,000	-18,4949	-12,1717
	fraksi n-heksana 50%	-13,33333*	,86373	,000	-16,4949	-10,1717

fraksi n-heksana 25%	-16,33333*	,86373	,000	-19,4949	-13,1717
fraksi n-heksana 12,5%	-11,66667*	,86373	,000	-14,8283	-8,5051
fraksi etil asetat 50%	-24,00000*	,86373	,000	-27,1616	-20,8384
fraksi etil asetat 25%	-24,66667*	,86373	,000	-27,8283	-21,5051
fraksi etil asetat 12,5%	-20,00000*	,86373	,000	-23,1616	-16,8384
fraksi air 50%	-16,33333*	,86373	,000	-19,4949	-13,1717
fraksi air 25%	-18,00000*	,86373	,000	-21,1616	-14,8384
fraksi air 12,5%	-14,00000*	,86373	,000	-17,1616	-10,8384
kloramfenikol	-29,33333*	,86373	,000	-32,4949	-26,1717

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

Homogeneous Subsets

diameter hambatan (mm)

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
DMSO 5%	3	,0000							
fraksi n-heksana 12,5%	3		11,6667						
fraksi n-heksana 50%	3		13,3333	13,3333					
fraksi air 12,5%	3		14,0000	14,0000					
ekstrak 12,5%	3			15,3333	15,3333				
fraksi n-heksana 25%	3			16,3333	16,3333	16,3333			
fraksi air 50%	3			16,3333	16,3333	16,3333			
ekstrak 50%	3				18,0000	18,0000	18,0000		
fraksi air 25%	3				18,0000	18,0000	18,0000		
ekstrak 25%	3					19,3333	19,3333		
fraksi etil asetat 12,5%	3						20,0000		
fraksi etil asetat 50%	3							24,0000	
fraksi etil asetat 25%	3							24,6667	
kloramfenikol	3								29,3333
Sig.		1,000	,328	,076	,167	,076	,558	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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