

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT dan AIR
DARI EKSTRAK METANOL DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus* Kunth)
TERHADAP *Bacillus subtilis* ATCC 6633**



Oleh :

**Hanim Faudiyah
19133921 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT dan AIR
DARI EKSTRAK METANOL DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus* Kunth)
TERHADAP *Bacillus subtilis* ATCC 6633**



SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
Derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh :

**Hanim Faudiyah
19133921 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT dan AIR
DARI EKSTRAK METANOL DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus* Kunth)
TERHADAP *Bacillus subtilis* ATCC 6633**

Oleh:

**Hanim Faudiyah
19133921A**

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 10 Juni 2017

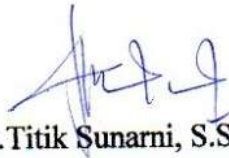
Mengetahui ,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan,

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

Pembimbing,



Dr. Titik Sunarni, S.Si., M.Si., Apt

Pembimbing Pendamping,



Dr. Ana Indrayati, M.Si.

Penguji :

1. Edy Prasetya, Drs
2. Anita Nilawati, M. Farm., Apt
3. Yane Dila Keswara, M. Sc., Apt
4. Ana Indrayati., M. Si., Dr

1.

2.

3.

4.

PERSEMBAHAN

“... Dan kebaikan apa saja yang kamu perbuat untuk dirimu niscaya kamu memperoleh balasan-Nya di sisi Allah sebagai balasan yang baik dan yang paling besar pahalanya”

(QS. Al-Muzzammil : 20)

“...Dan Dial ah Maha Mengetahui Segala Isi Hati” (Qur’an 57:6)

Skripsi ini kupersembahkan untuk Allah SWT, terimakasih ya Allah atas kesehatan dan ridho – Mu untuk menyelesaikan skripsi ini. Kedua Orang Tua ku, Saudara, Keluarga, dan Keluarga Baru ku yang telah memberikan kasih sayang dan motivasi dalam hidup.

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/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, April 2017



Hanim Faudiyah

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karuniaNYA sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK METANOL DAUN KENIKIR (*Cosmos Caudatus* K.) TERHADAP *Bacillus subtilis* ATCC 6633** “ ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar kesarjanaan pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

Dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak, maka pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ir. Djoni Taringan, MBA, selaku Rektor Universitas Setia Budi, Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, S.U.,M.M., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.
3. Dr. Titik Sunarni selaku pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, pengarahan dan dorongan selama penulisan skripsi ini.
4. Ana Indrayati selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, pengarahan dan dorongan selama penulisan skripsi ini.
5. Tim penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan demi kesempurnaan skripsi ini.
6. Seluruh staf perpustakaan Universitas Setia Budi Surakarta.
7. Keluarga tercinta yang telah memberikan semangat, doa, perhatian, dan kasih sayangnya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini ada banyak kekurangan, sehingga saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan demi sempurnanya skripsi ini. Semoga keberadaan skripsi ini berguna bagi mahasiswa Sarjana Farmasi dan semua orang yang membacanya.

Surakarta, Juni 2017

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|----------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| PENGESAHAN SKRIPSI | ii |
| PERSEMBAHAN..... | iii |
| PERNYATAAN..... | iv |
| KATA PENGANTAR | v |
| DAFTAR ISI..... | vi |
| DAFTAR GAMBAR | ix |
| DAFTAR TABEL..... | x |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xi |
| INTISARI..... | xii |
| ABSTRACT..... | xiii |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| A. Latar Belakang Masalah..... | 1 |
| B. Perumusan Masalah | 3 |
| C. Tujuan Penelitian | 3 |
| D. Kegunaan Penelitian..... | 3 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| A. Tanaman Kenikir (<i>Cosmos Caudatus Kunth</i>) | 5 |
| 1. Sistematika tanaman..... | 5 |
| 2. Nama lain tanaman..... | 5 |
| 3. Morfologi tanaman | 5 |
| 4. Kandungan tanaman | 6 |
| 5. Manfaat tanaman | 6 |
| B. Tinjauan Umum Fitokimia Tumbuhan..... | 6 |
| 1. Flavonoid..... | 6 |
| 2. Polifenol | 7 |
| 3. Minyak Atsiri | 7 |
| 4. Saponin..... | 7 |
| C. Simplisia..... | 8 |
| 1. Pengertian simplisia | 8 |
| 2. Pengumpulan simplisia..... | 8 |

| | | |
|---------------------------------|--|----|
| 3. | Pencucian pengeringan simplisia | 8 |
| D. | Metode penyarian | 9 |
| 1. | Ekstraksi | 9 |
| 2. | Maserasi..... | 10 |
| 3. | Fraksinasi..... | 10 |
| 4. | Cairan penyari untuk ekstraksi | 11 |
| 5. | Media..... | 12 |
| 6. | Sterilisasi | 12 |
| E. | Amoksisilin | 13 |
| F. | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 14 |
| 1. | Sistematika <i>B. subtilis</i> ATCC 6633..... | 14 |
| G. | Antibakteri..... | 15 |
| 1. | Pengertian antibakteri..... | 15 |
| 2. | Mekanisme kerja antibakteri | 15 |
| H. | Metode Difusi | 17 |
| I. | Metode Dilusi..... | 17 |
| J. | Kromatografi Lapis Tipis..... | 18 |
| K. | Landasan Teori..... | 18 |
| L. | Hipotesis..... | 20 |
| BAB III METODE PENELITIAN | | 21 |
| A. | Populasi dan Sampel | 21 |
| 1. | Populasi | 21 |
| 2. | Sampel | 21 |
| B. | Variabel Penelitian | 21 |
| 1. | Identifikasi variable utama | 21 |
| 2. | Klasifikasi variabel utama | 21 |
| 3. | Definisi opsional variabel utama..... | 22 |
| C. | Bahan dan Alat..... | 23 |
| 1. | Bahan..... | 23 |
| 2. | Alat | 23 |
| D. | Jalannya Penelitian..... | 23 |
| 1. | Determinasi tanaman..... | 23 |
| 2. | Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk daun kenikir | 24 |
| 3. | Penetapan kadar air daun kenikir | 24 |
| 4. | Pembuatan ekstrak metanol daun tanaman kenikir | 24 |
| 5. | Uji bebas metanol ekstrak daun kenikir | 24 |
| 6. | Mengidentifikasi kandungan senyawa kimia pada ekstrak daun kenikir..... | 25 |
| 7. | Fraksinasi dari ekstrak metanol daun kenikir..... | 25 |
| 8. | Sterilisasi alat dan bahan | 26 |
| 9. | Identifikasi makroskopis <i>B. subtilis</i> ATCC 6633..... | 26 |
| 10. | Identifikasi mikroskopis <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 dengan pewarnaan Gram..... | 26 |
| 11. | Uji Endospora..... | 26 |
| 12. | Identifikasi <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 dengan uji biokimia | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 13. Pembuatan suspensi bakteri <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | 27 |
| 14. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi | 28 |
| 15. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi | 28 |
| 16. Mengidentifikasi kandungan senyawa kimia pada fraksi teraktif (fraksi etil asetat) dari ekstrak daun kenikir..... | 29 |
| 17. Identifikasi kandungan kimia fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air secara Kromatografi Lapis Tipis | 30 |
| BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN..... | 34 |
| A. Hasil Penelitian | 34 |
| 1. Determinasi tanaman kenikir..... | 34 |
| 2. Pengambilan bahan..... | 34 |
| 3. Pembuatan serbuk daun kenikir | 34 |
| 4. Penetapan kadar air serbuk daun kenikir..... | 35 |
| 5. Pembuatan ekstrak maserasi daun kenikir..... | 35 |
| 6. Hasil uji bebas metanol ekstrak daun kenikir..... | 35 |
| 7. Hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak dan fraksi teraktif (fraksi etil asetat) daun kenikir | 36 |
| 8. Fraksinasi..... | 36 |
| 9. Identifikasi bakteri <i>B. subtilis</i> ATCC6633 | 37 |
| 10. Identifikasi biokimia <i>B. subtilis</i> ATCC 6633..... | 38 |
| 11. Pengujian aktivitas antibakteri daun kenikir secara difusi | 39 |
| 12. Identifikasi kimia fraksi paling aktif secara KLT | 41 |
| 13. Pengujian aktivitas antibakteri daun kenikir secara dilusi terhadap bakteri <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | 41 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN | 44 |
| A. Kesimpulan | 44 |
| B. Saran..... | 44 |
| DAFTAR PUSTAKA | 45 |
| LAMPIRAN..... | 49 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 1. Tanaman kenikir (<i>Cosmos Caudatus</i> K.)..... | 5 |
| Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak metanol dan fraksi daun kenikir (<i>Cosmos Caudatus</i> Kunth) | 31 |
| Gambar 3. Skema kerja uji aktivitas daun kenikir terhadap <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 secara difusi..... | 32 |
| Gambar 4. Skema kerja uji aktivitas fraksi teraktif ekstrak daun kenikir terhadap <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 secara dilusi | 33 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|--|---------|
| Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun kenikir | 34 |
| Tabel 2. Hasil penetapan kadar air serbuk daun kenikir | 35 |
| Tabel 3. Pembuatan ekstrak maserasi daun kenikir | 35 |
| Tabel 4. Hasil uji bebas metanol daun kenikir | 36 |
| Tabel 5. Hasil indentifikasi ekstrak dan fraksi teraktif daun kenikir | 36 |
| Tabel 6. Rendemen fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air | 37 |
| Tabel 7. Hasil identifikasi biokimia <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | 38 |
| Tabel 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak metanol dan fraksinasi daun kenikir terhadap <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 secara difusi | 40 |
| Tabel 9. Hasil identifikasi fraksi paling aktif secara kromatografi lapis tipis (KLT) | 41 |
| Tabel 10. Pengujian aktivitas antibakteri daun kenikir terhadap bakteri <i>B. subtilis</i> | 42 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|---|---------|
| Lampiran 1. Surat Keterangan Determinasi Tanaman Kenikir..... | 50 |
| Lampiran 2. Gambar daun dan serbuk daun kenikir | 51 |
| Lampiran 3. Gambar inkubator, <i>Rotary evaporator</i> dan <i>Sterling-Bidwel</i> , corong pisah | 52 |
| Lampiran 4. Foto identifikasi kimia secara kualitatif dan uji bebas metanol | 53 |
| Lampiran 5. Foto identifikasi kimia fraksi paling aktif secara KLT..... | 56 |
| Lampiran 6. Perhitungan Rf..... | 57 |
| Lampiran 7. Foto suspensi bakteri uji dan identifikasi bakteri | 58 |
| Lampiran 8. Pengenceran Sediaan ekstrak dan fraksi dengan menggunakan DMSO 5% | 60 |
| Lampiran 9. Foto hasil uji difusi ekstrak metanol, fraksi n-heksana, etil asetat dan air terhadap <i>B. subtilis</i> ATCC 6633..... | 61 |
| Lampiran 10. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun kenikir terhadap <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | 64 |
| Lampiran 11. Perhitungan rendemen simplisia daun kenikir..... | 67 |
| Lampiran 12. Perhitungan kadar air..... | 68 |
| Lampiran 13. Perhitungan rendemen ekstrak dan fraksi daun kenikir..... | 69 |
| Lampiran 14. Perhitungan Pengenceran DMSO 5%..... | 70 |
| Lampiran 15. Pembuatan seri konsentrasi larutan uji metode difusi ekstrak metanol, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air dari daun kenikir | 71 |
| Lampiran 16. Perhitungan konsentrasi fraksi etil asetat secara dilusi | 72 |
| Lampiran 17. Formulasi dan pembuatan media | 75 |
| Lampiran 18. Analisa data uji ANOVA antara ekstrak metanol, fraksi n-hesana, etil asetat dan air dengan konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% pada bakteri <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | 77 |

INTISARI

FAUDIAH, H., 2017, AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK METANOL DAUN KENIKIR (*Cosmos Caudatus* K.) TERHADAP *Bacillus subtilis* ATCC 6633 DENGAN METODE DIFUSI dan DILUSI, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Daun kenikir (*Cosmos Caudatus* K) mengandung flavonoid, saponin, minyak atsiri dan polifenol yang diduga memiliki aktivitas antibakteri. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dapat menyebabkan penyakit pada organ fungsi imun yang terganggu, misalnya meningitis, endokarditis, endoftalmitis, keracunan makanan dan diare. Tujuan penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak metanol daun kenikir (*Cosmos Caudatus* K) terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Serbuk daun kenikir diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol kemudian difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan air. Uji aktivitas antibakteri terhadap *B.subtilis* ATCC 6633 menggunakan metode difusi dan dilusi. Konsentrasi ekstrak dan fraksi yang digunakan untuk metode difusi adalah 50%, 25 %, dan 12,5%. Konsentrasi yang digunakan untuk metode dilusi adalah 50%, 25%,12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39% dan 0,190 %.

Berdasarkan metode difusi, daya hambat yang diperoleh dari konsentrasi 50 % ekstrak metanol 15 mm, fraksi *n*-heksana 16 mm, fraksi etil asetat 22 mm dan fraksi air 16 mm. KBM dari fraksi etil asetat terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 dengan metode dilusi adalah 6,25%. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri yang paling besar menghambat *B. subtilis* ATCC 6633.

Kata kunci : *Cosmos Caudatus* K., fraksinasi, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, antibakteri.

ABSTRACT

FAUDIYAH, H, 2017, ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FRACTION *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE AND WATER OF METHANOL LEAF EXTRACT KENIKIR (*Cosmos Caudatus* K.) AGAINST BACTERIA *Bacillus subtilis* ATCC 6633 , THESIS, FACULTY OF FARMCY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Leaf kenikir (*Cosmos Caudatus* K) contains flavonoids, saponins, essential oils and polyphenols that are suspected of having antibacterial activity. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 can cause diseases of immune function impaired, such as meningitis, endocarditis, endophthalmitis, food poisoning and diarrhea. The purpose of this research is to know the antibacterial activity of fraction of *n*-hexane, ethyl acetate and water from methanol leaf extract (*Cosmos Caudatus* K) to *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Leaf kenikir powder was extracted using maseration method with methanol solvent then fractionated using *n*-hexane, ethyl acetate, and water solvent. Test of antibacterial activity against *B. subtilis* ATCC 6633 using diffusion and dilution method. The concentration of extract and fraction used for the diffusion method was 50%, 25%, and 12.5%. The concentrations used for the dilution method were 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78%, 0.39% and 0.195%.

Based on the diffusion method, the inhibitory was obtained from concentration of 50% methanol extract 15 mm, 16 mm *n*-hexane fraction, 22 mm ethyl acetate fraction and 16 mm water fraction. KBM from ethyl acetate fraction to *B. subtilis* ATCC 6633 with dilution method was 6.25%. The ethyl acetate fraction has the greatest antibacterial activity inhibiting *B. subtilis* ATCC 6633.

Keywords: *Cosmos Caudatus* K., fractionation, *B. subtilis* ATCC 6633, antibacterial.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Mikroorganisme terdapat di mana-mana, seperti pada tanah, debu, udara, air, makanan atau pun permukaan jaringan tubuh kita. Keberadaan mikroorganisme tersebut ada yang bermanfaat bagi kehidupan manusia, tetapi banyak pula yang merugikan manusia misalnya dapat menimbulkan berbagai penyakit infeksi atau bahkan dapat menimbulkan kerusakan akibat kontaminasi (Ratnas 1990). Bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 merupakan bakteri berbentuk batang, tergolong bakteri gram positif, motil, menghasilkan spora yang biasanya resisten pada panas, bersifat aerob bervariasi dan termasuk bakteri kontaminan di udara yang tidak berbahaya tetapi keberadaannya dapat menyebabkan kerusakan pada makanan khususnya makanan kaleng dan akan menyebabkan infeksi pada manusia yang mengkonsumsinya (Talaro 2002).

Keracunan makanan yang disebabkan oleh bakteri sering terjadi pada situasi higienis yang rendah dan biasanya menyerang secara akut sehingga menyebabkan diare dan nyeri pada daerah perut serta terjadi dalam beberapa jam setelah makan makanan yang tercemar oleh bakteri patogen (Muslimin 1996 :88). Penyakit diare merupakan salah satu penyakit utama yang dapat disebabkan oleh bakteri yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat Indonesia. Angka kejadian diperkirakan antara 20-50 kejadian diare per 100 penduduk setiap tahunnya (Paramitha *et al.* 2010). Diare adalah gangguan pencernaan yang ditandai dengan penurunan konsentrasi tinja (menjadi lunak atau cair) dalam waktu 24 jam.

Penggunaan tanaman obat untuk penyembuhan suatu penyakit dan pemilihan bahan-bahan alami untuk pengobatan didasarkan pada pengalaman dan bukti penelitian. Selain lebih ekonomis, efek samping tanaman obat juga relatif kecil dibandingkan dengan obat-obat sintetik, maka penggunaan tanaman obat lebih aman dan efektif (Dalimartha 2006). *Cosmos caudatus* Kunth atau yang

lebih dikenal dengan kenikir merupakan herba yang tersebar dipulau jawa dan tumbuhan ini juga digunakan sebagai penyedap makanan, lalapan dan obat tradisional. Selain itu, beberapa penelitian gizi dan obat menunjukkan bahwa kenikir kaya akan senyawa bioaktif meliputi fenolat, flavonoid, karbohidrat, protein, mineral dan vitamin yang dapat meningkatkan nilai gizi (Abas *et al.* 2003). Studi pendahuluan mengenai fitokimia daun kenikir yang diekstrak menggunakan metanol dan pelarut lain menunjukkan adanya senyawa aktif flavonoid, saponin, terpenoid, alkaloid, tanin dan minyak atsiri yang berpotensi sebagai antimikroba, antioksidan dan antikanker (Rasdi *et al.* 2010).

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, ekstrak daun kenikir memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *candida albicans* (Rasdi *et al*2010). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui fraksi ekstrak daun kenikir yang aktif sebagai antibakteri, fraksinasi dilakukan dengan cara ekstraksi cair – cair, ekstrak metanol dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan air sehingga diperoleh fraksinasi pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Metode penyarian yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut metanol karena dapat menarik senyawa seperti steroid, saponin, flavonoid, fenolik (Astarina *et al* 2013). Fraksinasi yang dilakukan dengan menggunakan pelarut *n*-heksana,etil asetat dan air. Karena pelarut *n*-heksana bersifat nonpolar sehingga dapat menyari senyawa nonpolar pada ekstrak daun kenikir. Pelarut semipolar digunakan etil asetat karena sifatnya dapat menyari senyawa kimia yang bersifat semipolar sedangkan air digunakan sebagai pelarut polar karena air dapat menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar.

Berdasarkan latar belakang diatas penulis ingin melakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun kenikir terhadap bakteri *B. subtilis* dengan pemisahan komponen berdasarkan polaritasnya secara fraksinasi sehingga diketahui fraksi teraktif yang mempunyai daya hambat maupun daya bunuh terhadap *B. subtilis*.

B. Perumusan Masalah

Perumusan masalah yang timbul dalam penelitian ini adalah :

Pertama, apakah ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak metanol daun kenikir mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633?

Kedua, fraksi manakah diantara ketiga fraksi yaitu fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun kenikir yang memiliki efek antibakteri lebih tinggi terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633?

Ketiga, berapakah zona hambat dari metode difusi dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dan konsentrasi hambat minimum (KHM) dari metode dilusi hasil fraksi teraktif dari ekstrak metanol daun kenikir terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 ?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

Pertama, untuk mengetahui aktivitas ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak metanol daun kenikir terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633.

Kedua, untuk mengetahui fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri paling besar dari ekstrak methanol daun kenikir terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633

Ketiga, untuk mengetahui zona hambat dari metode difusi dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dan konsentrasi hambat minimum (KHM) dari metode dilusi hasil fraksi teraktif dari ekstrak metanol daun kenikir terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan informasi yang bermanfaat bagi pembaca dan masyarakat serta dapat menambah ilmu pengetahuan dibidang obat tradisional untuk digunakan dalam pemanfaatan daun kenikir sebagai obat tradisional terutama sebagai obat antibakteri . Bagi peneliti

diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah tentang manfaat ekstrak dan fraksi daun kenikir sebagai antibakteri terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 dan dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian lanjutan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Kenikir (*Cosmos Caudatus Kunth*)

1. Sistematika tanaman

Klasifikasi botani tanaman kenikir didalam sistematika tumbuhan sebagai Berikut (Hassan 2006):

| | |
|------------|---------------------------------|
| Divisi | : Spermatophyta |
| Sub Divisi | : Angiospermae |
| Kelas | : Dicotyledonae |
| Bangsa | : Asterales |
| Suku | : Asteraceae |
| Warga | : <i>Cosmos</i> |
| Jenis | : <i>Cosmos caudatus</i> kunth. |



Gambar 1 Tanaman kenikir (*Cosmos Caudatus K.*)

2. Nama lain tanaman

Nama ilmiah dari tanaman kenikir yaitu *Cosmos Caudatus* H.B.K. sedangkan nama daerahnya yaitu Ulam raja (Melayu), Kenikir (Jawa Tengah). dan nama asing nya yaitu yellow ray flower (inggris).

3. Morfologi tanaman

Kenikir termasuk keluarga *Asterceae*. Tumbuhan ini termasuk tumbuhan herbal semusim dengan tinggi antara 0,5-1,5m. Batang tegak, beralur dan mempunyai banyak percabangan serta berwarna hijau terang keunguan. Daunnya halus dan tajam. Daun majemuk berbentuk lanset dengan ujung yang meruncing

dan berwarna hijau dengan tepi daun bergerigi. Bunga dari tanaman ini berkumpul dalam kelompok pada satu tangkai (majemuk). Bunga majemuk mempunyai tangkai bunga berbentuk seperti cawan berwarna kuning. Setiap dibagian bawah bunga terdapat daun pembalut berwarna hijau berbentuk seperti lonceng. Buahnya keras berbentuk jarum dan ujungnya berambut. Biji keras, kecil, berbentuk jarum dengan panjang kurang lebih ± 1 cm serta berwarna hitam (Hassan 2006)

4. Kandungan tanaman

Beberapa kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan kenikir antara lain flavonoid dan polifenol. Tes fitokimia pendahuluan melalui screening juga menyebutkan bahwa pada daun kenikir mengandung terpenoid (minyak atsiri dan saponin (Harbone 1998; Liliwirianis 2011).

5. Manfaat tanaman

Daun dan batang muda kenikir segar ataupun kering dapat dimanfaatkan untuk mengobati beberapa penyakit seperti kurang nafsu makan, lemah jantung dan mengusir serangga.

B. Tinjauan Umum Fitokimia Tumbuhan

1. Flavonoid

Flavonoid merupakan golongan fenol alam yang melingkari 15 atom karbon inti dasarnya. Flavonoid tersusun dalam konfigurasi $C_6-C_3-C_6$ yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan-satuan yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Markham, 1988). Metanol, etanol 70%, aseton merupakan pelarut yang sering digunakan untuk ekstraksi flavonoid. Mekanisme kerja senyawa flavonoid sebagai antibakteri dalam merusak membran sel bakteri yaitu membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler sehingga membran sel bakteri rusak dan diikuti dengan masuknya air yang tidak terkontrol ke dalam sel bakteri, hal ini menyebabkan pembengkakan dan akhirnya membran sel bakteri pecah (Black dan Jacobs 1993). Selain itu, senyawa flavonoid memiliki kemampuan mendenaturasi protein sel bakteri dengan cara membentuk ikatan hidrogen kompleks dengan protein sel bakteri. Sehingga struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri yang mengandung protein menjadi tidak stabil dan

kehilangan aktivitas biologinya, akibatnya fungsi permeabilitas sel bakteri terganggu dan sel bakteri akan mengalami lisis yang berakibat pada kematian sel bakteri (Harborne 1987).

2. Polifenol

Polifenol merupakan kelompok zat kimia yang aktif sebagai antiseptik yang bekerja menghambat pertumbuhan mikroorganisme dengan mendenaturasi protein dan membran sel (Robinson 1995). Polifenol memiliki spektrum luas dengan sifat kelarutan pada pelarut yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh gugus hidroksil pada senyawa tersebut berbeda jumlah dan posisinya. Fitokimia polifenol banyak terdapat pada buah-buahan dan sayur-sayuran hijau. Penelitian pada hewan dan manusia menunjukkan bahwa polifenol dapat mengatur kadar gula darah seperti antikanker, antioksidan, dan antimikroba (Lenny 2006).

3. Minyak Atsiri

Minyak atsiri merupakan minyak yang paling mudah menguap pada suhu kamar tanpa mengalami dekomposisi, mempunyai rasa getir, beraroma wangi sesuai dengan aroma tumbuhan penghasilnya. Umumnya larut dalam pelarut organik dan tidak larut dalam air (Guenther 1987). Sebagian besar komponen minyak atsiri terdiri dari senyawa-senyawa yang mengandung karbon, oksigen dan hidrogen yang bersifat aromatik maupun tidak aromatik. Pada umumnya minyak atsiri terdiri dari senyawa dengan jumlah atom C berjumlah 10 yang disebut monoterpen dan atom C yang berjumlah 15 atau yang disebut sesquiterpen. Kemampuan minyak atsiri sebagai antibakteri yaitu dengan pengerusakan dinding sel bakteri (Alfarisi 2009).

4. Saponin

Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Saponin memiliki rasa pahit dan sangat tajam, disamping itu dapat menyebabkan iritasi pada membran mukosa. Terdapat dua jenis saponin yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan glikosida struktur steroid tertentu yang mempunyai rantai samping spiroketal. Kedua jenis saponin ini larut dalam air dan etanol tetapi tidak larut dalam eter, benzen dan *n*-heksana

(Robinson 1995; Doughari 2012). Beberapa saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri, yang menyebabkan komponen penting bakteri seperti protein, asam nukleat dan nukleotida keluar sehingga bakteri menjadi lisis (Alamsyah 2014).

C. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibedakan menjadi simplisia nabati dan simplisia hewani, pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan adalah isi sel yang secara spontan keluar dari selnya atau senyawa nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa senyawa murni. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan (mineral) adalah simplisia berupa bahan pelikan (mineral) yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia harus memenuhi persyaratan minimal untuk menjamin keseragaman senyawa aktif, keamanan maupun kegunaannya. Faktor yang mempengaruhi yaitu bahan baku simplisia, proses pembuatan simplisia serta cara penyimpanan bahan baku simplisia dan cara pengepakan (Depkes 1985).

2. Pengumpulan simplisia

Simplisia yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia nabati yaitu bagian daun. Kadar senyawa aktif dalam satu simplisia berbeda-beda tergantung pada bagian tanaman yang digunakan, umur tanaman, bagian tanaman, waktu panen dan lingkungan tempat tumbuh (Depkes 1985).

3. Pencucian pengeringan simplisia

Bahan tanaman yang sudah dikumpulkan dilakukan pencucian pada air bersih yang mengalir. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada bahan simplisia. Pencucian dapat mengurangi

mikroba pada simplisia tetapi tidak dapat membersihkan simplisia dari semua mikroba karena air yang digunakan untuk mencuci biasanya mengandung sejumlah mikroba. Bahan simplisia yang mengandung zat mudah larut dalam air maka pencuciannya dilakukan dalam waktu sesingkat mungkin (Depkes 1995).

Pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Pengurangan kadar air dan penghentian reaksi enzimatik dapat mencegah penurunan mutu yang perlu diperhatikan yaitu suhu pengeringan, kelembapan udara, aliran udara, waktu pengeringan dan luas permukaan bahan. Ada 2 cara pengeringan yang sudah dikenal luas yaitu pengeringan secara alamiah dan buatan. Pengeringan secara alamiah dapat dilakukan dengan sinar matahari langsung.

Cara ini dilakukan untuk mengeringkan bagian tanaman yang relatif keras seperti kayu, kulit kayu, biji dan bagian yang mengandung senyawa aktif yang relatif stabil apabila terkena panas, pengeringan alamiah lainnya dengan diangin-anginkan dan tidak dipanaskan dibawah sinar matahari langsung. Cara ini terutama untuk mengeringkan bagian tanaman yang lunak seperti bunga dan daun. Pengeringan buatan menggunakan suatu alat atau mesin pengering yang suhu, kelembapan, tekanan aliran udaranya dapat diatur. Kelebihan dari pengeringan buatan simplisia adalah simplisia yang diperoleh memiliki mutu yang lebih baik karena pengeringan akan lebih cepat tanpa dipengaruhi oleh keadaan cuaca (Depkes 1985).

D. Metode penyarian

1. Ekstraksi

Ekstraksi adalah tehnik pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan distribusi zat terlarut diantara dua pelarut yang saling bercampur. Pada umumnya zat terlarut yang diekstrak bersifat tidak larut atau larut sedikit dalam suatu pelarut tetapi mudah larut dengan pelarut lain. Metode ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur kandungan air bahan-bahan yang akan diekstrak dan senyawa-senyawa yang akan diisolasi (Harborne 1996).

2. Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Secara teknologi maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi dilakukan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (Depkes RI 2000).

Maserasi berasal dari bahasa latin *Macerace* berarti mengairi dan melunakan. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Dasar dari maserasi adalah melarutnya bahan kandungan simplisia dari sel yang rusak, yang terbentuk pada saat penghalusan, ekstraksi (difusi) bahan kandungan dari sel yang masih utuh, setelah selesai waktu maserasi artinya keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan masuk kedalam cairan, telah tercapai maka proses difusi segera berakhir. Selama maserasi atau proses perendaman dilakukan pengocokan berulang-ulang. Upaya ini menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat didalam cairan. Sedangkan keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolut. Semakin besar perbandingan simplisia terhadap cairan pengestraksi, akan semakin banyak hasil yang diperoleh (Voight 1994).

Kerugiannya adalah pengerjaannya lama, membutuhkan pelarut yang banyak dan penyarian kurang sempurna. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes RI 2000).

3. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pemisahan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran suatu senyawa. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan terlarut dalam pelarut polar, begitu pula sebaliknya senyawa-senyawa nonpolar akan terlarut dalam pelarut nonpolar.

Mula-mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Masing-masing pelarut selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut berdasarkan perbedaan kepolarannya, mula-mula disari dengan pelarut nopolar, kemudian disari pelarut semipolar dan yang terakhir disari dengan menggunakan pelarut polar (Harborne 1987). Pelarut *n*-heksana adalah pelarut yang bersifat nonpolar maka dapat menyari senyawa kimia yang nonpolar misalnya minyak atsiri, asam lemak, triterpenoid dan steroid (Pramono 2013 diacu dalam Susanti 2015). Pelarut semipolar digunakan etil asetat untuk melarutkan senyawa semipolar misalnya alkaloid, flavonoid, fenol, steroid dan triterpenoid (Pramono 2013 diacu dalam susanti 2015). Air sebagai pelarut polar untuk melarutkan senyawa polar misalnya tanin, flavonoid, fenol dan saponin (Robinson 1995).

4. Cairan penyari untuk ekstraksi

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

Metanol merupakan bentuk alkohol yang paling sederhana dari turunan alkohol. Metanol berbentuk cair yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan berbau khas. Metanol digunakan sebagai bahan pendingin, antibeku, pelarut, bahan bakar dan bahan aktif bagi industri metanol (Voight 1995). Metanol dapat menarik senyawa seperti alkaloid, steroid, saponin, flavonoid, fenolik dan tanin (Astarina *et al.* 2013).

Pelarut *n*-heksana merupakan pelarut nonpolar berupa cairan yang jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar dan mempunyai bau seperti eter lemah atau bau seperti petroleum, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa nonpolar antara lain minyak atsiri, terpenoid, triterpenoid, sterol, lemak, dan asam lemak, alkaloid, karotenoid, klorofil dan resin (Depkes 2005).

Etil asetat merupakan pelarut yang mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas rendah (USP 2007; Rowe *et al.* 2009; Wardhani dan

Sulistiyani 2012). Etil asetat bersifat semi polar sehingga mampu menarik senyawa aglikon maupun glikon flavonoid. Etil asetat dapat digunakan sebagai pelarut karena dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan polifenol (Putri *et al.* 2013).

Air dimanfaatkan sebagai penyari karena murah, mudah diperoleh, stabil, tidak mudah menguap dan terbakar, tidak beracun serta alamiah. Air dapat melarutkan gula, Gom, pati, protein, enzim, lender, lilin, lemak, peptida, minyak menguap, garam alkaloid, zat warna dan asam organik (List & Schamidt 2000).

5. Media

Media adalah tempat jaringan untuk tumbuh dan mengambil nutrisi yang mengandung kehidupan jaringan. Media tumbuh menyediakan berbagai bahan yang diperlukan jaringan untuk hidup dan memperbanyak diri. Mikroba dapat tumbuh dan berkembang biak, didalam media diperlukan persyaratan tertentu, yaitu media harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba dan media harus dalam keadaan steril (Abdurrahman 2008).

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

6. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan suatu proses untuk membunuh semua jasad renik yang ada, sehingga jika ditumbuhkan didalam suatu medium tidak ada lagi jasad renik yang dapat berkembang biak. Sterilisasi harus dapat membunuh jasad renik yang paling tahan panas seperti bakteri. Sterilisasi dengan autoclaf biasanya disebut sterilisasi basah atau sterilisator uap yang mudah diangkat dengan menggunakan uap air jenuh bertekanan pada suhu 121⁰C disebabkan oleh tekanan 1 atm. Selain metode sterilisasi basah dapat juga digunakan metode lain seperti

perebusan, tyndalisasi, pasteurisasi, pemanasan kering, radiasi, radiasi ionisasi, penyaringan dan lain-lain (Fardiaz 2001).

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

E. Amoksisilin

Amoksisilin merupakan penisilin semisintetik yang rentan terhadap penisilinase dan secara kimia serta farmakologis berhubungan dengan ampisilin. Antibiotik ini bekerja menghambat pembentukan mukopeptida yang diperlukan untuk sintesis dinding sel mikroorganisme (Goodman & Gilman 2007).

Amoksisilin termasuk golongan penisilin berspektrum luas. Amoksisilin stabil dalam suasana asam dan digunakan secara oral. Absorpsi amoksisilin dari gastrointestinal lebih cepat dan lebih sempurna daripada ampisilin karena absorpsi amoksisilin tidak terganggu dengan adanya makanan dalam lambung. Spektrum antimikroba amoksisilin pada dasarnya sama dengan ampisilin (Goodman & Gilman 2007).

Mekanisme kerja amoksisilin dengan menghambat mukopeptida yang diperlukan dalam sintesis dinding sel bakteri. Aktivitas amoksisilin mirip dengan ampisilin yang efektif terhadap bakteri gram positif dan gram negatif yang patogenik. Bakteri yang sensitif terhadap amoksisilin adalah *Staphylococci*, *Enterococci*, *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *H.influenzae*, *Streptococci*, dan *S. pneumonia*. Kelemahan amoksisilin adalah sifatnya yang peka terhadap penisilinase (β -laktamase) yaitu enzim yang diproduksi oleh bakteri. Enzim ini mencegah antibiotik β -laktamase untuk mencapai target pada membran sitoplasma dengan cara merusak saat antibiotik tersebut melewati membran luar dan lapisan

periplasma (Hazar *et al.* 2014). Amoksisilin digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian aktivitas antibakteri.

F. *Bacillus subtilis* ATCC 6633

1. Sistematika *B. subtilis* ATCC 6633

1.1 Sistematika bakteri. Bakteri *B. subtilis*. Menurut (Madigan 2005), adalah sebagai berikut :

| | |
|---------|------------------------------|
| Kingdom | : Bacteria |
| Phylum | : Firmicutes |
| Class | : Bacilli |
| Ordo | : Bacillales |
| Family | : Bacillaceae |
| Genus | : Bacillus |
| Species | : <i>Bacillus subtilis</i> . |

1.2 Morfologi dan Sifat. Bakteri ini termasuk bakteri gram positif, katalase positif yang umum ditemukan di tanah. *B. subtilis* mempunyai kemampuan untuk membentuk endospora yang protektif yang memberi kemampuan bakteri tersebut mentolerir keadaan yang ekstrim. *B. subtilis* dapat mengkontaminasi makanan yang menyebabkan keracunan makanan.

Bacillus secara alami dapat di mana-mana dan termasuk spesies yang hidup bebas atau bersifat patogen. Beberapa spesies *Bacillus* menghasilkan enzim ekstraseluler seperti protease, lipase, amilase dan selulase yang bisa membantu pencernaan dalam tubuh hewan (Wongsa dan Werukhamkul 2007).

1.3 Patogenesis. Patogenesis bakteri *B. subtilis* pada manusia adalah menyebabkan penyakit pada organ fungsi imun yang terganggu, misalnya meningitis, endokarditis, endoftalmitis, keracunan pada makanan dan diare. *B. subtilis* dapat menyebabkan kerusakan pada makanan kaleng yang juga dapat mengakibatkan gastroenteritis pada manusia yang mengkonsumsinya. Untuk mencegah pertumbuhan bakteri pada bahan makanan umumnya digunakan bahan kimia pengawet berupa zat kimia sintetis. Alternatif lain yang memungkinkan

untuk dikembangkan adalah pemanfaatan senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh tumbuhan (Nursal *et al.* 2006).

Bakteri *B. subtilis* adalah bakteri batang berspora (endospora) yang Gram positif dan bersifat aerob. *B. subtilis* dapat menyebabkan meningitis, endokarditis, infeksi mata dan lain-lainnya (FKUI 1993). *B. subtilis* merupakan bakteri berbentuk batang, tergolong bakteri gram positif, motil, menghasilkan spora yang biasanya resisten pada panas, bersifat aerob bervariasi. Tiap spesies berbeda dalam penggunaan gula, sebagian melakukan fermentasi dan sebagian tidak jenis mempunyai kemampuan yang berbeda-beda, diantaranya : mendegradasi senyawa organik seperti protein, pati, selulosa, hidrokarbon dan agar dentrifikasi anaerob, asidofilik, psikoprifilik, atau termofilik.

G. Antibakteri

1. Pengertian antibakteri

Antibakteri adalah suatu zat atau senyawa yang dapat menekan atau membunuh pertumbuhan bakteri. Senyawa atau zat yang digunakan untuk membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia, harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin.

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada bakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai zat bakteriostatik dan ada yang bersifat membunuh bakteri yang disebut bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya masing-masing dikenal sebagai KHM dan KBM (Ganiswarna 2007).

2. Mekanisme kerja antibakteri

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok, yaitu mengganggu metabolisme sel bakteri, yang menghambat sintesis dinding sel bakteri, yang merusak membran sel bakteri, yang menghambat sintesis protein sel bakteri dan yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri (Ganiswara 2007).

2.1 Penghambatan metabolisme sel bakteri. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari Para Aminobenzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikuti sertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional sehingga kebutuhan akan asam folat tidak terpenuhi hal ini dapat menyebabkan bakteri mati (Ganiswara 1995).

2.2 Penghambatan sintesis dinding sel. Dinding bakteri terdiri dari polipeptidoglikan. Polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks primer glikopeptida. Salah satu kerja antibakteri adalah menghambat sintesis dinding sel. Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Ganiswara 1995).

2.3 Perubahan permeabilitas membran sel bakteri. Selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Salah satu kerja antibakteri adalah mengubah tegangan permukaan sehingga merusak permeabilitas selektif dari membran sel mikroba. Kerusakan membrane sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Ganiswara 1995).

2.4 Penghambatan sintesis protein sel bakteri. Untuk kehidupannya, bakteri perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada waktu sintesis protein, akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan non fungsional bagi sel mikroba (Ganiswara 1995).

2.5 Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri. DNA, RNA dan protein memegang peranan penting dalam kehidupan normal sel. Salah satu kerja antibakteri yang lain adalah mekanisme berikatan dengan enzim polymerase RNA oleh enzim tersebut (Ganiswara 1995).

H. Metode Difusi

Metode difusi adalah suatu uji aktivitas dengan menggunakan cakram yang berliang renik atau silinder tidak beralas yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada pembedahan padat yang telah ditanami dengan biakan bakteri yang akan diperiksa. Selain inkubasi, garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri yang diperiksa. Metode ini yang akan ditentukan aktivitas antimikrobanya berdifusi pada lempeng *Blood Agar Plate* yang telah ditanami mikroba yang akan diuji. Dasar penggunaannya adalah terbentuk atau tidaknya zona hambatan pertumbuhan bakteri disekeliling cakram atau silinder yang berisi zat antimikroba (Harminta 2004).

Keuntungan dari metode difusi dibandingkan metode dilusi yaitu lebih ekonomis, sederhana, mudah dibuat dan reproduksibel. Prosedur yang paling sering digunakan dan dianjurkan oleh *World Health Organisation* (WHO) dan *Nation Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) adalah metode difusi cakram modifikasi *Kirby Bauer*. Kelemahan metode ini karena tidak bisa digunakan untuk semua jenis mikroba misalnya mikroba dengan pertumbuhan lambat ataupun anaerob obligat (Depkes 1999).

I. Metode Dilusi

Metode dilusi dilakukan dengan mencampurkan secara homogen suatu obat dalam media dengan jumlah yang berbeda-beda atau membuat larutan obat dengan kadar yang berbeda-beda, masing-masing media ditambahkan suspensi kuman kemudian diinkubasi dan diamati daerah media yang jernih (Bonang & Koeswardono 1982). 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 ini adalah memberikan hasil kualitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al.* 1986), dan satu konsentrasi agen antimikroba yang di uji dapat

digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi 2008). Kekurangan metode dilusi yaitu sampel yang digunakan harus jernih karena jika keruh akan mempersulit pengamatan (Putra 2010).

J. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah suatu metode untuk pemisahan kandungan dalam suatu zat. Kelebihan KLT adalah keserbagunaan, kecepatan, dan kepekaan. Keserbagunaan KLT disebabkan oleh kenyataan bahwa disamping selulosa, sejumlah penyerap yang berbeda dapat disaputkan pada pelat kaca atau penyangga lain. Walaupun silika gel yang paling banyak digunakan, kecepatan KLT dipengaruhi oleh sifat penyerap yang lebih padat bila disaputkan pada pelat. Satu kekurangan KLT adalah kerja penyaputan pelat kaca dengan penjerap, bubuk silika gel yang harus dikocok kuat-kuat tiap jangka waktu tertentu, pengeringan pada suhu kamar dan pengaktifan dengan pemanasan pada suhu 100-110 °C selama 30 menit (Harborne 1987).

K. Landasan Teori

Bakteri *B. subtilis* adalah bakteri batang berspora (endospora) yang Gram positif dan bersifat aerob. *B. subtilis* dapat menyebabkan meningitis, endokarditis, infeksi mata dan lain-lainnya (FKUI 1993). *B. subtilis* merupakan bakteri berbentuk batang, tergolong bakteri gram positif, motil, menghasilkan spora yang biasanya resisten pada panas, bersifat aerob bervariasi. Bakteri *B. subtilis* pada manusia adalah menyebabkan penyakit pada organ fungsi imun yang terganggu, misalnya meningitis, endokarditis, endoftalmitis, keracunan pada makanan dan diare. *B. subtilis* dapat menyebabkan kerusakan pada makanan kaleng yang juga dapat mengakibatkan gastroenteritis pada manusia yang mengkonsumsinya (Nursal *et al.* 2006).

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat adalah tanaman kenikir merupakan salah satu jenis tumbuhan yang dimanfaatkan untuk mengobati beberapa penyakit seperti kurang nafsu makan, lemah jantung dan pengusir serangga dan menghambat pertumbuhan beberapa bakteri seperti *B.*

subtilis, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *candida albicans*. Beberapa kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan kenikir antara lain flavonoid dan polifenol. Tes fitokimia pendahuluan melalui screening juga menyebutkan bahwa pada daun kenikir mengandung terpenoid (minyak atsiri, alkaloid, dan saponin (Harbone 1998; Liliwirianis 2011).

Pada ekstrak metanol daun kenikir mengandung flavonoid dan polifenol yang dapat mengakibatkan gangguan metabolisme pada sel bakteri. Gugus fenol dari senyawa flavonoid dan polifenol berikatan dengan protein bakteri melalui ikatan hidrogen, mengakibatkan struktur protein menjadi rusak dan enzim menjadi inaktif (Harborne 1987). Gugus fenol dari senyawa flavonoid dan polifenol berikatan dengan protein bakteri melalui ikatan hidrogen, mengakibatkan struktur protein menjadi rusak dan enzim menjadi inaktif (Harborne 1987). Minyak atsiri dalam ekstrak daun kenikir dapat mengganggu terbentuknya membran atau dinding sel (Ajizah 2004). Gangguan tersebut diakibatkan oleh terpenoid dari minyak atsiri akan mengikat protein, lipid ataupun karbohidrat pada membran maupun dinding sel (Harborne 1987). Sementara saponin akan membentuk senyawa kompleks dengan protein bakteri melalui ikatan hidrogen sehingga dapat mengganggu permeabilitas membran sel bakteri (Cannell 1998 dalam Rinawati 2011).

Senyawa-senyawa dari daun kenikir yang dapat larut dalam *n*-heksana antara lain minyak atsiri. Pelarut etil asetat dari daun kenikir dapat melarutkan senyawa-senyawa seperti, flavonoid, saponin, dan polifenol. Penelitian yang dilakukan oleh Rasdi dkk (2010) membuktikan adanya aktivitas ekstrak etanolik daun kenikir terhadap *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan 1 jamur: *Candida albicans* menggunakan pelarut *n*-heksana, dietil eter, dan etanol dengan metode difusi dan konsentrasi ekstrak yang digunakan 20 g/mL; 50 mg/mL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun kenikir mempunyai aktivitas terhadap bakteri *B. subtilis* dengan rata-rata diameter daya hambat yang terbentuk dengan perlakuan ekstrak *n*-heksana didapatkan zona hambat 8,67 mm dan 9,00 mm dan pada perlakuan ekstrak dietil eter didapatkan zona hambat 7,67 mm dan 9,00 mm pada perlakuan ekstrak etanol

didapatkan zona hambat 9,33 mm dan 9,67 mm. Sedangkan rata-rata diameter daya hambat untuk kontrol positif tetrasiklin 30 µg adalah 17 mm dan kontrol negatif nistatin 30 µg adalah 0,00 mm. Nilai KHM ekstrak *n*-heksan, dietil eter dan etanol daun kenikir terhadap *B. subtilis* adalah 25 mg/mL, 6,25 mg/mL, dan 12,5 mg/mL. Pada penelitian tersebut menyebutkan bahwa daun kenikir mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif yaitu *B. subtilis*.

Ekstrak metanol daun kenikir diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *B. subtilis* yang telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *B. subtilis*. Fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun kenikir diharapkan memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana dan fraksi air karena senyawa yang tertarik dalam fraksi etil asetat secara maksimal senyawa-senyawa semipolar yang diduga aktif sebagai antibakteri seperti flavonoid, saponin, dan polifenol. Fraksi etil asetat diharapkan dapat menarik golongan senyawa aktif flavonoid yang telah terbukti sebagai antibakteri pada daun kenikir yang difraksi menggunakan pelarut etil asetat.

L. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada maka hipotesis dalam penelitian ini adalah :

Pertama, diantara fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak metanol daun kenikir mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih kuat terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 dibanding ekstrak metanol daun kenikir pada metode difusi dan dilusi

Kedua, dari ketiga fraksi daun kenikir tersebut terdapat fraksi yang paling aktif dalam membunuh *B. subtilis* ATCC 6633 yaitu fraksi etil asetat.

Ketiga, zona hambat dari metode difusi dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dan konsentrasi hambat minimum (KHM) dari metode dilusi hasil fraksi teraktif dari ekstrak metanol daun kenikir terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 ditentukan dari hasil penelitian.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kenikir yang diambil dari Desa Dadapan Kabupaten Sragen, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kenikir. Daun yang digunakan ialah daun yang berwarna hijau yang masih segar yang kemudian dikeringkan serta dibuat serbuk dan diambil pada bulan februari 2016 di Desa Dadapan Kabupaten Sragen Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variable utama

Variabel utama kedua Variabel utama adalah variabel yang membuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama penelitian ini adalah fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak metanol daun kenikir pada bakteri *B. subtilis* ATCC 6633.

Dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak metanol daun kenikir pada bakteri *B. subtilis* ATCC 6633.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian adalah berbagai konsentrasi fraksi yang digunakan sebagai uji antibakteri terhadap bakteri *B. subtilis*.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah bakteri uji *B. subtilis*, kondisi laboratorium (meliputi kondisi inkas, alat serta bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, tempat tumbuh tanaman, waktu panen, pemilihan daun dan metode ekstraksi.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel terikat dalam metode ini adalah pertumbuhan bakteri *B. subtilis* di media uji yang dipengaruhi oleh fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak metanol daun kenikir.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kenikir adalah daun yang berwarna hijau yang diambil dari daerah Dadapan Kabupaten Sragen, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun kenikir adalah daun kenikir yang dipetik kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran, setelah itu dikeringkan dengan panas cahaya matahari, kemudian dihaluskan dan diayak.

Ketiga, ekstrak metanol daun kenikir adalah hasil ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan 1:10 yang direndam selama 5 hari dan sesekali digojog kemudian dipekatkan sampai bebas metanol.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah hasil fraksi dari ekstrak metanol daun kenikir yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut nonpolar sehingga didapat fraksi *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksi yang diperoleh dari residu fraksi *n*-heksana dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semipolar sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah fraksi yang diperoleh dari residu fraksi etil asetat dengan menggunakan air sebagai pelarut polar sehingga didapat fraksi air.

Ketujuh, *B. subtilis* adalah bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Delapan, uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi adalah metode yang digunakan untuk mengukur zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk. Metode dilusi adalah metode yang digunakan untuk menentukan KHM dan KBM dengan membuat berbagai seri konsentrasi dengan cara penapisan sampai konsentrasi akhir.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan utama. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kenikir yang tidak terlalu tua juga tidak terlalu muda yang masih segar yang diperoleh dari Desa Dadapan, kabupaten Sragen, Jawa Tengah. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *B. subtilis* ATCC 6633 biakan murni.

1.2 Medium. Medium yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA) , *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mueller Hinton Agar* (MHA), NA-Amilum 0,5%.

1.3 Bahan kimia. Pelarut metanol, pelarut *n*-heksana, etil asetat, DMSO 5%, Butanol, asam asetat, air, asam formiat, toluen.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu Erlenmeyer (pyrex), spirtus, kasa, kaki tiga, selang, corong kaca, penangas air, timbangan, alat ukur (pyrex), pipet volume, labu takar , inkas, jarum ose, pinset, rak tabung, ayakan no 40, oven, seperangkat alat *rotary evaporator*, *sterling-bidwel*, plat KLT, *detector sinar* 254 dan 366 nm, autoclaf, inubator, kotak septis, beaker glass, pipet ukur dan batang pengaduk, kondensor, mikroskop, corong pisah autoclaf.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dalam tahap penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel dengan mencocokkan morfologi yang ada pada tanaman kenikir dengan acuan buku serta dibuktikan di Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret.

2. Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk daun kenikir

Kenikir yang digunakan adalah bagian daun tumbuhan yang masih segar diambil pada waktu sore hari karena pada saat itu tanaman proses fotosintesis telah berhenti sehingga kandungan yang terdapat pada tanaman berkumpul. Daun kenikir yang diambil dari daerah Dadapan Kabupaten Sragen, Jawa Tengah.

Daun kenikir dicuci bersih dengan air mengalir hingga terbebas dari kotoran dan debu, dirajang lalu ditimbang setelah itu dikeringkan dan diserbuk dengan blender, selanjutnya diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh serbuk daun kenikir.

3. Penetapan kadar air daun kenikir

Penetapan kadar air serbuk daun kenikir dilakukan dengan menggunakan alat *sterling-bidwell*. Caranya dengan menimbang ekstrak daun kenikir sebanyak 20 gram, dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut *xylene* sampai ekstrak terendam, kemudian memasang alat *sterling-bidwell*, lalu dipanaskan dengan api kecil, setelah mendidih apinya dibesarkan, pemanasan dihentikan bila tetesan sudah tidak ada air yang menetes, kemudian diukur kadar airnya dengan menggunakan alat *sterling-bidwell* dengan melihat volume pada skala alat tersebut.

4. Pembuatan ekstrak metanol daun tanaman kenikir

Serbuk daun kenikir dimasukkan kedalam bejana lalu ditambahkan metanol dengan perbandingan maserasi dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojog, setelah itu dipisahkan antara filtrat dengan ampas dengan menggunakan corong *Buchner*. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40⁰C sehingga menjadi ekstrak metanol daun kenikir dan ditunjukkan pada gambar 2.

5. Uji bebas metanol ekstrak daun kenikir

Uji bebas metanol dilakukan dengan cara esterifikasi alkohol. Ekstrak daun kenikir ditambahkan asam asetat dan asam salisilat kemudian dipanaskan. Uji positif bebas metanol bila tidak terdapat bau ester berarti sudah tidak ada metanol.

6. Mengidentifikasi kandungan senyawa kimia pada ekstrak daun kenikir.

Identifikasi senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam ekstrak daun kenikir. Identifikasi kandungan senyawa kimia dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

6.1 Identifikasi Flavonoid. Ekstrak dan fraksi teraktif ditimbang sebanyak masing-masing dibuat dengan cara ekstrak metanol daun kenikir disuspensikan dengan air 0,5 gram lalu dilarutkan dalam metanol panas dan menambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCL pekat. Hasil positif ditunjukkan warna jingga (Setyowati *et al.* 2014).

6.2 Identifikasi Saponin. Identifikasi dilakukan dengan memasukan 0,5 g sampel kedalam tabung reaksi, ditambah 10 ml air panas, kemudian didinginkan lalu di kocok kuat-kuat selama 10 menit. Saponin positif terbentuk bila terbentuknya busa stabil (Setyowati *et al.* 2014)

6.3 Identifikasi Minyak Atsiri. Identifikasi dilakukan dengan cara penambahan 1 tetes asam sulfat pekat kepada serbuk daun kenikir akan memberikan warna ungu (Gunawan & Mulyani 2004).

6.4 Identifikasi Polifenol. Sebanyak 0,5 gram sampel kedalam tabung reaksi kemudian ditambah 1 ml larutan FeCl_3 10%, lalu dikocok kuat sampai homogen. Jika terbentuk warna hijau, merah, ungu, biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan, hijau biru menunjukkan adanya polifenolat (Robinson 1995).

7. Fraksinasi dari ekstrak metanol daun kenikir

Fraksi *n*-heksana daun kenikir lalu difraksinasi dengan pelarut nonpolar *n*-heksana dalam corong pisah. Filtrat yang diatas fraksi *n*-heksana diulang 3 kali dipisahkan dari filtrat yang dibawah sehingga didapat fraksi *n*-heksana. Fraksi etil asetat daun kenikir dibuat dari residu *n*-heksana difraksi kembali dengan pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar dalam corong pisah. Fraksi yang diatas (fraksi etil asetat). Fraksi air daun kenikir dibuat dengan cara fraksinasi dari residu etil asetat kemudian didapat fraksi air.

8. Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian harus dalam kondisi yang steril. Cawan petri, pipet volume, tabung reaksi, dan pinset disterilkan dengan oven. Jarum ose disterilkan dengan pembakaran, yaitu dengan membakarnya sampai berwarna kemerahan dengan lampu spiritus. Media disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu mencapai 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1-2 atm.

9. Identifikasi makroskopis *B. subtilis* ATCC 6633

Identifikasi *B. subtilis* dari biakan murni ditanam pada media NA, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam akan terbentuk koloni berwarna putih, cembung dan elevasi rata (Volk dan Wheller 1988).

10. Identifikasi mikroskopis *B. subtilis* ATCC 6633 dengan pewarnaan Gram

Pewarnaan gram untuk mengetahui morfologi bakteri dan membedakan antara bakteri gram positif dengan gram negatif. Bakteri *B. subtilis* diambil dengan menggunakan jarum ose dan dioleskan pada objek gelas, difiksasi diatas api spiritus, kemudian smear pada objek gelas ditetesi dengan gram A (larutan Kristal violet) selama 1 menit lalu buang kelebihan zat warna, ditetesi lagi dengan Gram B (*Lugol's iodine*) selama 2 menit lalu buang kelebihan warna kemudian dibilas dengan air, ditetesi dengan pemucat warna yaitu gram C (etanol 70%) tetes demi tetes selama 30 detik atau sampai zat warna Kristal violet tidak terlihat lagi mengalir dari objek gelas kemudian dibilas dengan air, dan terakhir tetesi safranin kemudian dibilas dengan air. Jika dilihat dibawah mikroskop, bakteri gram positif berwarna ungu, karena dapat menahan kompleks pewarna primer karbol gentin violet iodium sampai akhir prosedur pewarnaan (sulistyaningsih 2008).

11. Uji Endospora

Endospora adalah suatu badan refraktil yang terdapat dalam sel dan merupakan suatu stadium istirahat dari sel tersebut. Endospora memiliki tingkat metabolisme yang sangat rendah sehingga dapat hidup samapai bertahun-tahun tanpa memerlukan sumber makanan dari luar (Irianto 2006). Pembentukan spora dapat dianggap sebagai suatu proses diferensiasi dari suatu siklus hidup dalam

keadaan-keadaan tertentu. Hal ini berbeda dari peristiwa pembelahan sel karena tidak terjadi replikasi kromosom (Pelezar 1986).

Pewarnaan spora dilakukan dengan mengambil bakteri *B. subtilis* dengan menggunakan jarum ose dan dioleskan pada objek gelas, difiksasi diatas api spirtus, kemudian smear pada objek gelas kemudian ditetesi larutan *malachet Green* dengan menggunakan penjepit tabung diatas api selama 5 menit (hingga uap terlihat), jangan biarkan uap mengering atau mendidih. Setelah itu didiamkan selama 1 menit kemudian bilas dengan akuades selama 30 detik. Setelah itu ditetaskan safranin selama 30 detik dan dikeringkan tanpa fikasasi pemanasan kemudian diamati dibawah mikroskop spora berwarna hijau dan bagian sel vegetatifnya bewarna merah (Waluyo 2008).

12. Identifikasi *B. subtilis* ATCC 6633 dengan uji biokimia

12.1 Uji Katalase. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengoleskan biakan murni *B. subtilis* pada objek gelas selanjutnya ditetesi pereaksi H₂O₂. Jika terbentuk gas berupa gelembung-gelembung udara pada pereaksi H₂O₂ maka hasil uji katalase positif adalah bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 (Lay 1994).

12.2 Uji Amilase. Pengujian ini dilakukan menumbuhkan bakteri *B. subtilis* pada medium NA-amilum 0,5% dan ditetaskan larutan iodin diinkubasi selama 18-24 jam. Zona bening yang terbentuk di sekitar cakram menunjukkan adanya aktivitas enzim amilase (wahyu *et al* 2013)

13. Pembuatan suspensi bakteri *B. subtilis* ATCC 6633

B. subtilis diambil dari suatu biakan murni sebanyak beberapa ose, kemudian digoreskan pada media NA kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi digunakan sebagai stok bakteri uji *B. subtilis*

Beberapa ose biakan *B. subtilis* diambil dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 5 ml BHI campuran dikocok sampai homogen diinkubasi 5-8 jam kemudian dilihat kekeruhan sesuai dengan standart Mc Farland 0,5 dengan jumlah koloni 1×10^8 CFU/mL suspensi diencerkan sebanyak 1:1000 untuk pengujian dilusi.

14. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

Sediaan ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun kenikir diuji aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis* menggunakan metode difusi. Larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dengan konsentrasi yaitu 12,5%, 25%, 50% . .

Bakteri uji diinokulasi pada media MHA 30 mL yang berada dalam cawan petri. Kemudian larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air, dipipet dimasukkan kedalam cawan petri setelah itu diletakkan kertas cakram yang berisi larutan uji diatas media. Pada media diletakkan kontrol positif, yaitu amoksisilin dan sebagai kontrol negatif ditetesi dengan DMSO 5%. Replikasi dilakukan tiga kali. Masa inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat yang terbentuk. Pengujian aktivitas antibakteri ditunjukkan pada gambar 2.

15. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah dari sediaan yang dapat menghambat bakteri uji. Metode ini menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 11 tabung steril dengan interval pengenceran dua kali secara aseptis. Metode dilusi dilakukan dengan bahan uji dimasukkan dalam masing-masing tabung reaksi dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,563%, 0,78%, 0,39%, 0,195% kecuali kontrol positif. Pembuatan larutan stok fraksi teraktif menggunakan pelarut DMSO 5%. Medium BHI 0,5 mL dimasukkan dalam masing-masing tabung uji secara aseptis kecuali tabung pertama. Larutan stok fraksi teraktif sebanyak 1 mL dimasukkan dalam tabung pertama, dari tabung pertama diambil 0,5 mL dimasukkan tabung kedua, dari tabung kedua diambil 0,5 mL dimasukkan tabung ketiga dan begitu seterusnya sampai tabung ke delapan. Ambil 0,5 mL dari tabung delapan kemudian dibuang. Suspensi bakteri dalam medium BHI dimasukkan dalam tiap tabung uji sebanyak 0,5 ml kecuali kontrol negatif. Kontrol negatif berisi 1 mL bahan uji dan kontrol positif berisi 1 mL suspensi bakteri. Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian amati kekeruhannya.

KHM ditentukan dengan cara menentukan konsentrasi terendah larutan uji dari tabung yang jernih. Tabung yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Mengamati ada atau tidaknya koloni lunak berwarna putih, cembung dan elevasi rata. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media MHA yang tidak menunjukkan adanya koloni bakteri yang tumbuh. Pengujian aktivitas antibakteri dan ditunjukkan pada gambar 4.

16. Mengidentifikasi kandungan senyawa kimia pada fraksi teraktif (fraksi etil asetat) dari ekstrak daun kenikir.

Identifikasi senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun kenikir. Identifikasi kandungan senyawa kimia dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

16.1 Identifikasi Flavonoid. Fraksi etil asetat daun kenikir disuspensikan dengan air 0,5 gram lalu dilarutkan dalam metanol panas dan menambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCL pekat. Hasil positif ditunjukkan warna jingga (Setyowati *et al.* 2014).

16.2 Identifikasi Saponin. Identifikasi di lakukan dengan memasukan 0,5 g sampel kedalam tabung reaksi, ditambah 10 ml air panas, kemudian didinginkan lalu di kocok kuat-kuat selama 10 menit. Saponin positif terbentuk bila terbentuknya busa stabil (Setyowati *et al.* 2014)

16.3 Identifikasi Minyak Atsiri. Identifikasi dilakukan dengan cara penambahan 1 tetes asam sulfat pekat pada fraksi etil asetat daun kenikir akan memberikan warna ungu (Gunawan & Mulyani 2004).

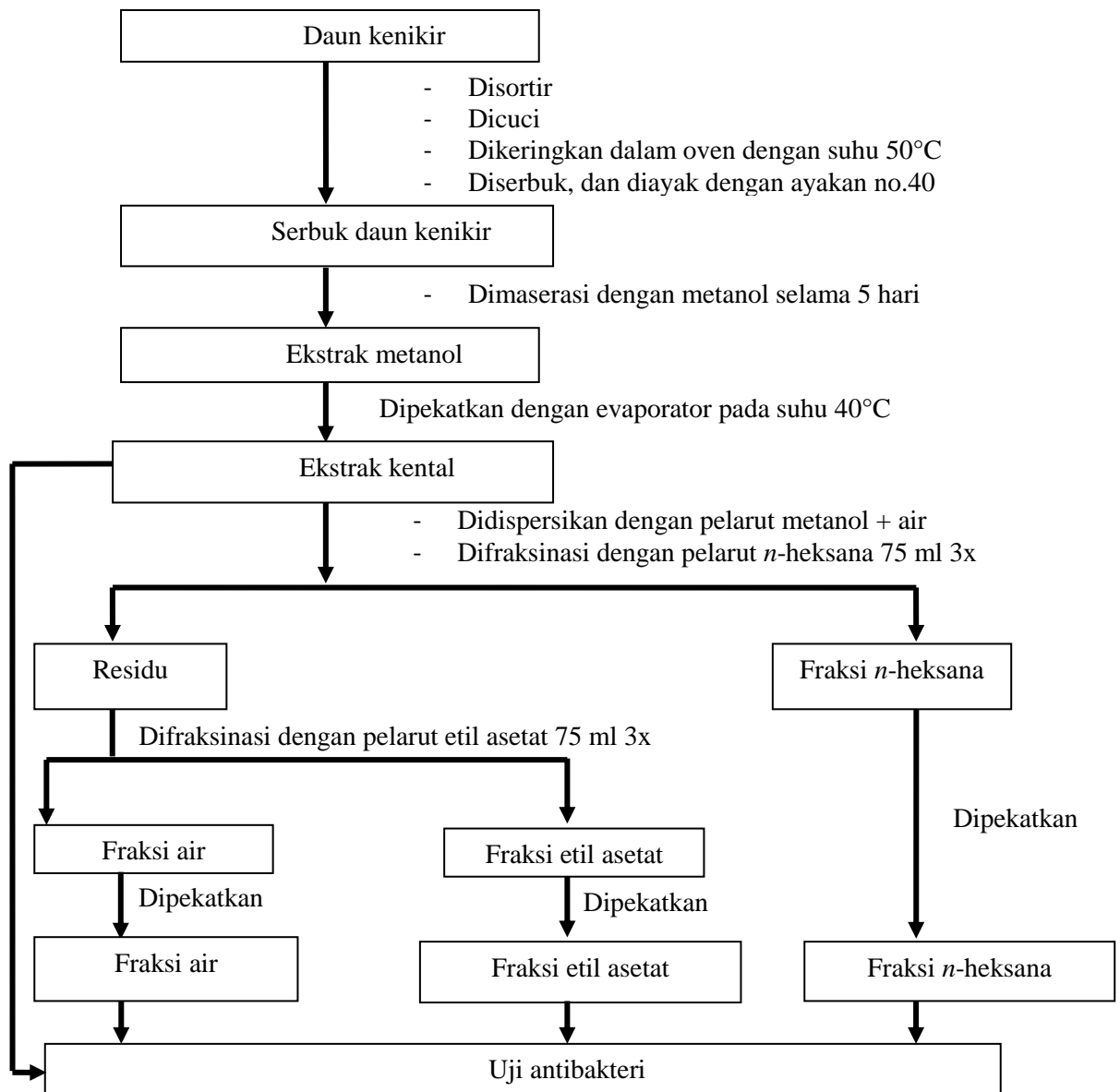
16.4 Identifikasi Polifenol. Sebanyak 0,5 gram sampel kedalam tabung reaksi kemudian ditambah 1 ml larutan FeCl₃ 10%, lalu dikocok kuat sampai homogen. Jika terbentuk warna hijau, merah, ungu, biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan, hijau biru menunjukkan adanya polifenolat (Robinson 1995).

17. Identifikasi kandungan kimia fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air secara Kromatografi Lapis Tipis

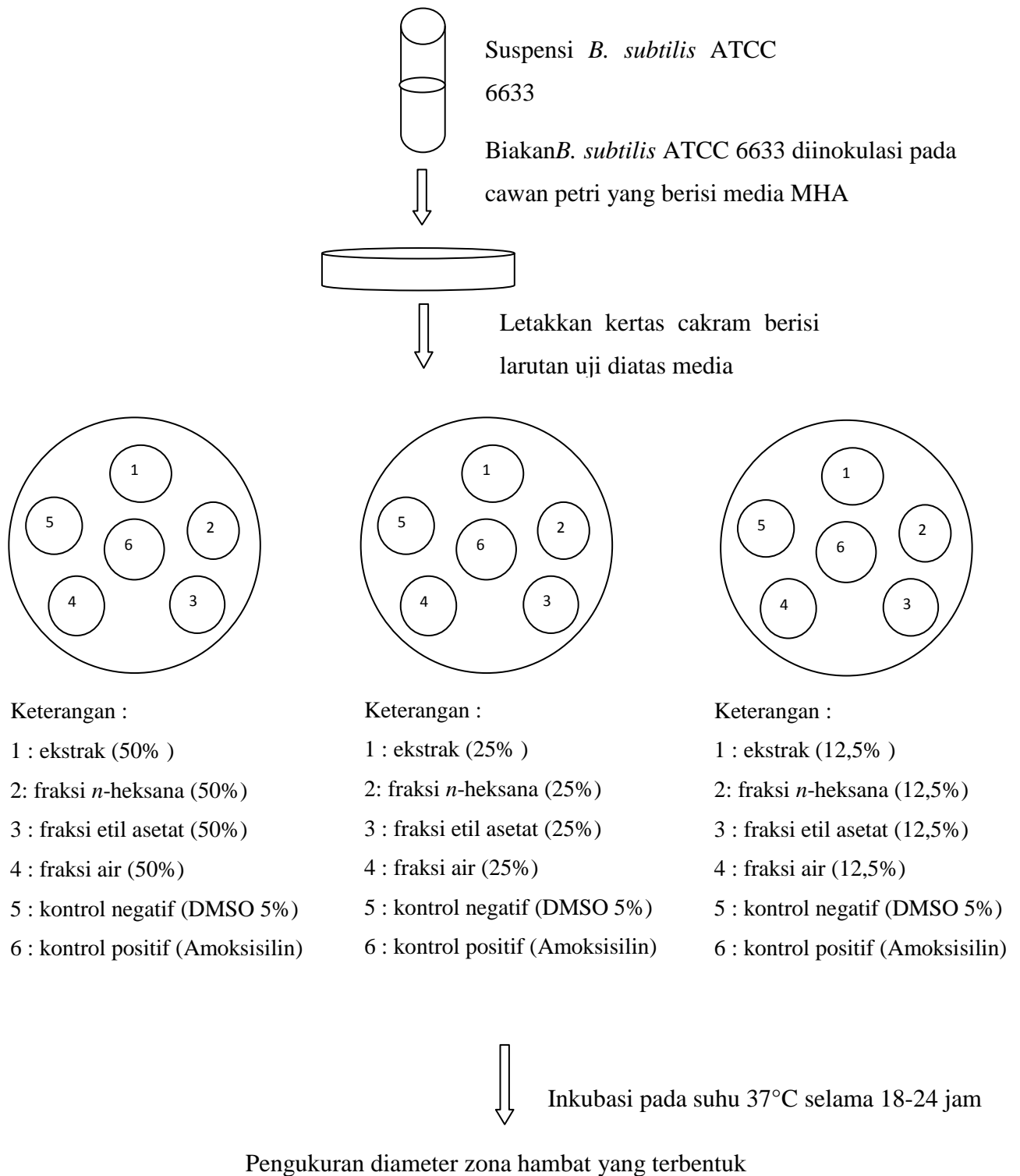
Fraksi teraktif ekstrak metanol daun kenikir dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, kemudian totolkan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari sisi bawah lempeng KLT. Lapsi bak kromatografi dengan kertas saring. Jenuhkan bak kromatografi dengan fase gerak yang sesuai, ditandai dengan kertas saring terbasahi semuanya. Setelah totolan kering, masukkan lempeng KLT pada bak kromatografi yang sudah dijenuhkan, elusi dilakukan sampai jarak tertentu. Angkat lempeng KLT angin-anginkan hingga kering, kemudian deteksi noda di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm serta pereaksi tertentu. Bercak yang terdeteksi kemudian ditentukan harga R_f nya dan penampakan warnanya.

16.1. Identifikasi Flavonoid. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254 dan fase geraknya BAW (4 : 5 : 1) dengan pereaksi semprot sitroborat. Bila dengan UV 254 nm memberikan peredaman, UV 366 nm berflouresensi biru, kuning, ungu gelap (Harborne 2006).

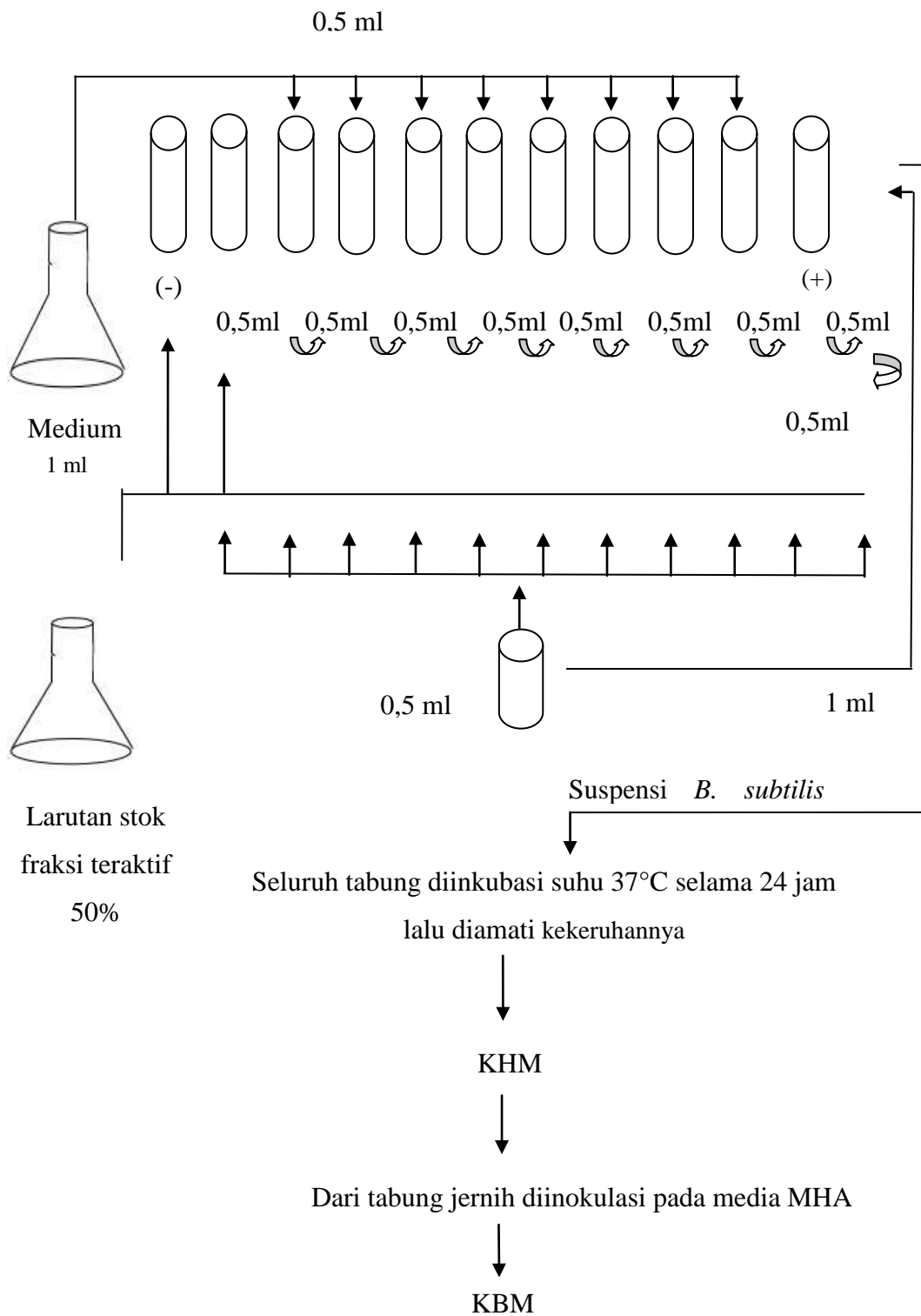
16.2 Identifikasi Polifenol. Identifikasi senyawa polifenol menggunakan KLT yaitu fase diam silika gel GF₂₅₄, Fase gerak : Etil asetat : asam formiat : toluen : air (6 : 1,5 : 3 : 0,5), dideteksi pada sinar UV ada bercak gelap, disemprot dengan pereaksi FeCl₃ agar timbul warna ungu (Harborne 2006).



Gambar 2 Skema pembuatan ekstrak metanol dan fraksi daun kenikir (*Cosmos Caudatus Kunth*)



Gambar 3 Skema kerja uji aktivitas daun kenikir terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 secara difusi



Gambar 4 Skema kerja uji aktivitas fraksi teraktif ekstrak daun kenkir terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 secara dilusi

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi tanaman kenikir

1.1 Determinasi tanaman kenikir. Determinasi tanaman bertujuan untuk mencocokkan morfologis yang terdapat pada tanaman yang akan digunakan untuk penelitian dengan kunci determinasi, mengetahui kebenaran tanaman yang diambil dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Farmasi Universitas Sebelas Maret, disimpulkan bahwa tanaman yang digunakan adalah daun kenikir (*Cosmos Caudatus K.*) Hasil determinasi dapat di lihat di lampiran 1.

2. Pengambilan bahan

Daun kenikir diambil pada waktu sore hari karena menghasilkan metabolisme yang besar yang disebabkan proses fotosintesis telah berhenti sehingga senyawa-senyawa berkumpul dan diambil secara acak yang masih segar dan hijau yang diperoleh dari desa Dadapan, Kabupaten sragen, Jawa Tengah pada bulan Februari 2017.

3. Pembuatan serbuk daun kenikir

Berat basah daun kenikir sebanyak 8000 gram dikeringkan di oven pada suhu 50°C. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air supaya tidak mudah ditumbuhi oleh kapang atau bakteri dan untuk menghilangkan aktivitas enzim yang dapat menguraikan zat aktif dan memudahkan proses penggilingan maupun penyimpanan. Daun kenikir yang telah kering kemudian dibuat serbuk didapatkan sebanyak 1200 gram.

Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun kenikir

| Bobot basah (g) | Bobot kering (g) | Rendemen (%) |
|-----------------|------------------|--------------|
| 8000 | 1200 | 15 |

Berdasarkan tabel 1 hasil perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun kenikir didapatkan rendemen sebesar 15%. Rendemen merupakan perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal.

Rendemen ekstrak dapat digunakan sebagai parameter efisiensi ekstraksi (Depkes RI 2000).

4. Penetapan kadar air serbuk daun kenikir

Kadar air pada serbuk daun kenikir dihitung berdasarkan hasil volume yang didapat dari alat *Sterling-bidwell* setelah didestilasi dengan *xylene*. Hasil penetapan kadar air serbuk daun kenikir dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar air serbuk daun kenikir

| No | Penimbangan (gram) | Volume pada skala (ml) | Kadar air % |
|-----------|--------------------|------------------------|-------------|
| 1 | 20 | 1,70 | 8,5% |
| 2 | 20 | 1,60 | 8 % |
| 3 | 20 | 1,60 | 8% |
| Rata-rata | | | 8,16 % |

Berdasarkan tabel 2 hasil perhitungan kadar air serbuk daun kenikir yang dilakukan sebanyak 3 kali didapatkan kadar air sebesar 8,16% < 10%. Kadar air tidak boleh lebih dari 10 % karena dapat merubah komposisi kimia dari simplisia sehingga dapat menurunkan kualitas simplisia (DepKes RI 1995). Air merupakan media pertumbuhan mikroorganisme yang dapat merusak simplisia. Berdasarkan dari penetapan kadar air serbuk daun kenikir dapat disimpulkan bahwa serbuk daun kenikir ini memenuhi syarat karena prosentase kadar air serbuk daun kenikir kurang dari 10%. Perhitungan penetapan kadar air daun kenikir dapat dilihat pada lampiran 10.

5. Pembuatan ekstrak maserasi daun kenikir

Tabel 3. Pembuatan ekstrak maserasi daun kenikir

| Bahan sampel (g) | Bobot ekstrak (g) | Rendemen ekstrak (%) |
|------------------|-------------------|----------------------|
| 900 | 162,21 | 18,02 |

Persentase rendemen maserat daun kenikir yang diperoleh sebanyak 18,02 %. Uji organoleptis maserat daun kenikir berwarna hijau tua dan berbentuk kental. Maserat kemudian di fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Hasil perhitungan rendemen ekstrak daun kenikir dapat dilihat pada lampiran 11.

6. Hasil uji bebas metanol ekstrak daun kenikir

Ekstrak metanol daun kenikir diuji keberadaan alkoholnya dengan melakukan uji esterifikasi alkohol.

Tabel 4. Hasil uji bebas metanol daun kenikir

| Uji bebas alkohol | Hasil pengamatan | Pustaka (praeparandi 2006) |
|--|--|--|
| Ekstrak daun kenikir + asam sulfat pekat + asam asetat, dipanaskan | Tidak tercium bau ester yang khas dari etil asetat (bebas metanol) | Tidak tercium bau ester yang khas dari etil asetat |

Hasil uji bebas metanol menunjukkan bahwa ekstrak daun kenikir sudah bebas dari metanol hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etil asetat (Praeparandi 2006).

7. Hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak dan fraksi teraktif (fraksi etil asetat) daun kenikir

Tabel 5. Hasil indentifikasi ekstrak dan fraksi teraktif daun kenikir

| Senyawa | Hasil percobaan | Hasil pustaka | Ekstrak | Fraksi etil asetat |
|---------------|---------------------------------|---|---------|--------------------|
| Flavonoid | Warna jingga | Terjadi warna jingga (Setyowati <i>et al</i> 2014). | Positif | Positif |
| Polifenol | Warna ungu | Terjadi warna hitam kehijauan (Robinson 1995). | Positif | Positif |
| Minyak atsiri | Terjadi warna ungu | Terjadi warna ungu (Gunawan & Mulyani 2004) | Positif | Negatif |
| Saponin | Terjadi buih setelah pengocokan | Buih mantap selama tidak kurang 10 menit (Setyowati <i>et al</i> 2014). | Positif | Positif |

Berdasarkan identifikasi yang telah dilakukan diatas menunjukkan bahwa ekstrak daun kenikir mengandung senyawa flavonoid, polifenol, minyak atsiri dan saponin sedangkan pada fraksi teraktif mengandung flavonoid, polifenol, dan saponin. Selanjutnya akan di pastikan kembali dengan uji identifikasi senyawa dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Identifikasi kandungan senyawa ekstrak metanol daun kenikir dilakukan secara analisis kualitatif dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat dilihat pada lampiran 5.

8. Fraksinasi

Fraksinasi adalah proses pemisahan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran (Harborne 2006). Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan terlarut dalam pelarut polar, begitu pula sebaliknya senyawa-senyawa nonpolar akan terlarut dalam pelarut nonpolar. Fraksinasi dilakukan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Fraksinasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dan

fraksinasi dilakukan sebanyak 6 kali sehingga total penggunaan ekstrak untuk fraksinasi 60 gram. Pengulangan dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan efisiensi dari proses penyarian senyawa. Penyarian yang baik diperoleh apabila jumlah ekstraksi yang dilakukan berulang dengan penambahan jumlah pelarut sedikit demi sedikit (Khopkar 2003). Hasil rendemen fraksi dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 6. Rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air

| No | Fraksi | Bobot fraksi (g) | Rendemen (%) |
|----|-------------------|---------------------|-----------------|
| 1 | <i>n</i> -heksana | 11,26 | 18,77% |
| 2 | Etil asetat | 7,17 | 11,95% |
| 3 | Air | 11,42 | 19,03% |

Berdasarkan hasil rendemen pada tabel 6 fraksinasi ekstrak metanol daun kenikir menunjukkan kandungan senyawa yang terlarut dalam fraksi polar lebih banyak dibanding senyawa semipolar dan nonpolar. Hasil rendemen yang berbeda dari tiap fraksi. Fraksi *n*- heksana didapatkan rendemen 18,77% , fraksi etil asetat didapatkan 11,95% sedangkan pada fraksi air didapatkan rendemen 19,03%. Rendemen-rendemen tersebut berkaitan dengan banyaknya senyawa yang terkandung didalam daun kenikir dapat dilihat pada lampiran 11.

9. Identifikasi bakteri *B. subtilis* ATCC6633

9.1 Metode identifikasi morfologi. Identifikasi *B. subtilis* ATCC 6633 yang digoreskan pada medium *Natrium agar* (NA) setelah diinokulasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C. Hasil pengamatan koloni yang dihasilkan berwarna putih, cembung dan elevasi rata (Volk dan Wheller 1988). Gambar hasil identifikasi makroskopis *B. subtilis* ATCC 6633 dapat dilihat pada lampiran 7.

9.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengelompokkan bakteri menjadi 2 yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pewarnaan Gram menggunakan 4 jenis reagen yaitu Gram A (cat Kristal violet sebagai cat utama) Gram B (lugol iodine sebagai mordant) Gram C (Etanol: aseton =1 : 1) dan Gram D (cat safranin sebagai cat lawan/ penutup) (Jawetz *et al.* 2008). Hasil pewarnaan Gram *B. subtilis* ATCC 6633 setelah dilihat menggunakan mikroskop perbesaran 100x didapatkan bakteri berbentuk batang berwarna ungu (Gram positif). Hal ini terjadi karena *B. subtilis* ATCC 6633

mempunyai dinding sel yang sangat tebal dan tersusun oleh sebagian besar peptidoglikan yang dapat mengikat warna dan tidak rusak setelah penambahan Gram C sehingga dapat mempertahankan warna kristal violet. Hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada lampiran 6.

9.3 Pewarnaan Endospora. Endospora adalah suatu badan refraktil yang terdapat dalam induk sel dan merupakan suatu stadium istirahat dari sel tersebut. Endospora memiliki tingkat metabolisme yang sangat rendah sehingga dapat hidup sampai bertahun-tahun tanpa memerlukan sumber makanan dari luar (Irianto 2006). Pewarnaan Endospora dilakukan untuk mengetahui bakteri yang mempunyai spora atau tidak mempunyai spora. Pewarnaan Endospora menggunakan 2 jenis reagen yaitu *Malachite Green* dan safranin. Pada metode *Schaeffer-Fulton* endospora diwarnai dengan *Malachite Green*. Larutan ini merupakan pewarna yang kuat yang dapat masuk ke dalam endospora dan safranin yang hasil pewarnaannya akan muncul warna hijau pada spora serta warna merah pada sel (Lay 1994). Spora dibentuk oleh bakteri tertentu untuk mengatasi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi bakteri tersebut. Spora bakteri dapat diwarnai dengan cara difiksasi diatas api spirtus. Lapisan ini dapat menyebabkan lapisan luar spora mengembang sehingga zat warna dapat masuk. Pada uji Endospora setelah diamati menggunakan mikroskop dapat disimpulkan bahwa *B. Subtilis* ATCC 6633 termasuk bakteri yang membentuk spora (Waluyo 2008). Hasil pewarnaan endospora dapat dilihat pada lampiran 6.

10. Identifikasi biokimia *B. subtilis* ATCC 6633

Hasil identifikasi biokimia dilakukan dengan uji katalase dan uji amilase pada *B. subtilis* ATCC 6633 berdasarkan tabel 7 dan gambar hasil identifikasi dapat dilihat dalam lampiran 7.

Tabel 7. Hasil identifikasi biokimia *B. subtilis* ATCC 6633

| No | Pengujian | Hasil | Keterangan |
|----|-----------|-------|--------------------------|
| 1 | Katalase | + | (gelembung) |
| 2 | Amilase | + | (jernih sekitar cakram) |

Ada 2 cara yang dapat digunakan untuk identifikasi bakteri secara biokimia yaitu katalase dan amilase.

10.1 Uji Katalase. Uji katalase berguna untuk mengidentifikasi kelompok bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase. Penelitian positif ditunjukkan dengan adanya gelembung udara atau buih yang disebabkan adanya enzim katalase yang dimiliki *B. Subtilis* ATCC 6633. $H_2O_2 \rightarrow H_2 + O_2$. Hidrogen peroksida terbentuk pada metabolisme aerob sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob pasti menguraikan bahan tersebut. Enzim katalase digunakan untuk pertumbuhan aerob karena H_2O_2 yang dibentuk oleh berbagai enzim pernafasan bersifat racun terhadap sel mikroba (Lay 1994). Hasil uji katalase *B. subtilis* ATCC 6633 dapat dilihat pada lampiran 6.

10.2 Uji Amilase. Uji amilase berguna untuk mengidentifikasi kelompok bakteri yang dapat menghasilkan enzim amilase. Hasil pengujian pada medium dengan penambahan amilum mampu menghasilkan zona bening disekitar cakram pada media NA-amilum 0,5% hal ini menunjukkan bahwa *B. subtilis* ATCC 6633 menghasilkan enzim amilase. Enzim amilase merupakan enzim yang berfungsi mengkatalisis reaksi hidrolisis pati menjadi gula-gula sederhana jika terdapat adanya amilum atau produk hidrolisisnya seperti maltosa di dalam medium tumbuh (Wahyu 2013). Hasil dapat dilihat pada lampiran 6.

11. Pengujian aktivitas antibakteri daun kenikir secara difusi

Ekstrak dan fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun kenikir dengan metode difusi dengan konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% dan Kontrol positif yang digunakan amoksisilin karena mempunyai mekanisme kerja dengan menghambat mukopeptida yang diperlukan dalam sintesis dinding sel bakteri. DMSO 5% sebagai kontrol negatif terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 karena dapat melarutkan ekstrak metanol daun kenikir tanpa menghasilkan daya hambat. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi dengan waktu inkubasi 18-24 jam dengan suhu 37⁰C. Daerah jernih di sekitar cakram yang tidak ditumbuhi bakteri menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak metanol daun kenikir memiliki daya hambat terhadap *B. subtilis* ATCC 6633. Hasil luas daerah hambat pengujian aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak daun kenikir dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak metanol dan fraksinasi daun kenikir terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 secara difusi

| | | Diameter hambat (mm) | | | Rata-rata (mm) \pm SD |
|--------------------------|-------------|----------------------|----|-----|-------------------------|
| Sampel | Konsentrasi | Replikasi | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | |
| Ekstrak metanol | 50% | 15 | 14 | 14 | 14,3 \pm 0,58 |
| | 25% | 12 | 13 | 12 | 12,3 \pm 0,58 |
| | 12,5% | 9 | 8 | 8 | 8,3 \pm 0,58 |
| Fraksi <i>n</i> -heksana | 50% | 16 | 15 | 15 | 15,3 \pm 0,58 |
| | 25% | 12 | 10 | 12 | 11,3 \pm 1,73 |
| | 12,5% | 9 | 8 | 10 | 9 \pm 1,54 |
| Fraksi etil asetat | 50% | 21 | 21 | 22 | 21,3 \pm 1 |
| | 25% | 18 | 18 | 17 | 17,6 \pm 0,58 |
| | 12,5% | 15 | 16 | 16 | 15,6 \pm 8,58 |
| Fraksi air | 50% | 14 | 15 | 13 | 14 \pm 1 |
| | 25% | 9 | 8 | 9,4 | 8,5 \pm 0,70 |
| | 12,5% | 7 | 7 | 7,5 | 7 \pm 4,05 |
| Amoksisilin | 25 μ g | 26 | 26 | 26 | 26 \pm 0 |
| DMSO 5% | | - | - | - | 0 \pm 0 |

Keterangan :

(-) : tidak terbentuk daerah hambatan bakteri pada media MHA

Perhitungan *Kolmogorov-Smirnov test* diperoleh Signifikansi = 0,795 > 0,05 (H_0 diterima). ANOVA *one way*. Nilai probabilitas Lavene Statistik adalah 0,0740 > 0,05 maka H_0 (diterima) yang artinya ketiga sampel memiliki varian yang sama atau homogen.

Dari uji statistik menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri lebih baik dibanding ekstrak, fraksi *n*-heksana dan air. Namun dilihat dari uji statistik pada uji difusi fraksi etil asetat memiliki daya hambat yang paling efektif terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 dibandingkan ekstrak, fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Daya hambat fraksi etil asetat yang terbesar pada konsentrasi 50% karena fraksi etil asetat dapat menarik senyawa yang terkandung dalam daun kenikir yang diduga adalah flavonoid, saponin dan polifenol dibanding dengan ekstrak, fraksi *n*-heksana dan fraksi air karena senyawa yang dikandung lebih sedikit yang bersifat antibakteri dibanding fraksi etil asetat sehingga daya hambat yang dihasilkan lebih kecil. Penggunaan antibiotik amoksisilin lebih efektif

digunakan dimasyarakat karena mekanisme kerja amoksisilin dengan menghambat mukopeptida yang diperlukan dalam sintesis dinding sel bakteri yang merupakan bahan sintesis dibanding dengan hasil ekstrak maupun fraksi dari daun kenikir karena diameter hambat yang dihasilkan oleh antibiotik amoksisilin lebih besar terhadap *B. subtilis* dibanding ekstrak dan fraksi. Hasil difusi dapat dilihat pada lampiran 15.

12. Identifikasi kimia fraksi paling aktif secara KLT

Identifikasi terhadap kandungan kimia dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) hanya dilakukan pada fraksi etil asetat karena fraksi ini mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *B. subtilis* ATCC 6633. Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui beberapa senyawa antibakteri yang terkandung pada fraksi etil asetat.

Tabel 9. Hasil identifikasi fraksi paling aktif secara kromatografi lapis tipis (KLT)

| Senyawa | Fase gerak | Warna Sinar | | Rf | Pereaksi semprot (Harborne 2006) |
|-----------|---|-------------|-----------|--|----------------------------------|
| | | UV 254 nm | UV 366 nm | | |
| Flavonoid | Butanol–asam asetat – air (4 : 5 : 1) | Gelap | Ungu | 0,86 | Sitroborat |
| Polifenol | Etil asetat– asam formiat – toluen – air (6:1,5:3: 0,5) | Gelap | Ungu | Rf 1 = 0,29 Rf 2 = 0,47 Rf 3 = 0,73 Rf 4 = 0,78 | FeCl ₃ |

13. Pengujian aktivitas antibakteri daun kenikir secara dilusi terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633

Hasil sediaan dari fraksi etil asetat daun kenikir dilanjutkan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 menggunakan metode dilusi untuk mendapat Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari fraksi yang paling poten.

Pengujian aktivitas sediaan dari fraksi etil asetat daun kenikir dilakukan terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 dengan konsentrasi larutan masing-masing 50,%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,195%.

Suspensi bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 yang digunakan dalam medium BHI yang kemudian dicampur dengan fraksi etil asetat daun kenikir tidak terlihat karena sampel yang digunakan dalam penelitian ini keruh sehingga mempersulit pengamatan KHM. Inokulasi dari tabung pada medium agar dalam cawan petri perlu dilakukan sehingga diketahui konsentrasi bunuh minimum. Hasil uji antibakteri dengan metode dilusi terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 dan dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 10. Pengujian aktivitas antibakteri daun kenikir terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 secara dilusi

| No | Konsentrasi % Kelompok sediaan uji | Replikasi | | |
|----|---------------------------------------|-----------|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | Kontrol (-) fraksi etil asetat + BHI | - | - | - |
| 2 | Konsentrasi 50% | - | - | - |
| 3 | Konsentrasi 25% | - | - | - |
| 4 | Konsentrasi 12,5% | - | - | - |
| 5 | Konsentrasi 6,25% | - | - | - |
| 6 | Konsentrasi 3,125% | + | + | + |
| 7 | Konsentrasi 1,56% | + | + | + |
| 8 | Konsentrasi 0,78% | + | + | + |
| 9 | Konsentrasi 0,390% | + | + | + |
| 10 | Konsentrasi 0,195% | + | + | + |
| 11 | Kontrol (+) suspensi bakteri | + | + | + |

Keterangan :

(+) : ada pertumbuhan koloni bakteri

(-) : tidak ada pertumbuhan koloni bakteri

Pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat, terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 dilanjutkan dengan metode dilusi untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM). KBM yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan menginokulasi sediaan dari tabung uji pada medium MHA pada cawan petri. KBM ditentukan pada medium MHA dengan konsentrasi minimum yang tidak menunjukkan pertumbuhan *B. subtilis* ATCC 6633. Berdasarkan tabel 9 dapat dilihat bahwa uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 secara dilusi dilakukan 3 kali replikasi. Konsentrasi fraksi yang digunakan yaitu 50,%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,195%. KHM dapat dilihat dari kejernihan pada tabung yang menunjukkan bahwa pada tabung konsentrasi tertentu dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil KHM daun kenikir tidak

dapat ditentukan karena tertutupi oleh kekeruhan dari fraksi yang digunakan. KBM menunjukkan adanya antibakteri fraksi yang dapat dilihat dari pengujian fraksi terhadap bakteri uji pada tabung yang kemudian diinokulasikan pada media MHA dengan dilihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 pada media MHA. Fraksi etil asetat mempunyai KBM 6,25%. *B. subtilis* merupakan bakteri kontaminasi yang berada diudara jika berada didalam tubuh dalam jumlah yang besar akan menyebabkan toksin dan infeksi. Penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk membuat zat aktif yang dapat membunuh bakteri *B. subtilis* yang sudah dibuktikan dengan uji dilusi dengan KBM 6,25%.

Fraksi etil asetat adalah fraksi yang paling aktif. Hasil tersebut disebabkan oleh adanya kandungan senyawa semipolar di fraksi etil asetat yang lebih banyak dibandingkan senyawa di dalam fraksi *n*-heksana dan fraksi air daun kenikir dalam menghambat pertumbuhan bakteri *B. subtilis* ATCC 6633. Aktivitas antibakteri yang efektif dari fraksi etil asetat daun kenikir diduga adalah flavonoid, saponin dan polifenol.

Senyawa flavonoid memiliki mekanisme kerja dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menginaktivasi protein (enzim) pada membran sel (Rinawati 2011). Selain itu flavonoid juga mempunyai mekanisme kerja sebagai antibakteri yaitu dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa yang ada di dalam sel (Ngajow *et al.* 2013).

Saponin memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri, yang menyebabkan komponen penting bakteri seperti protein, asam nukleat dan nukleotida keluar sehingga bakteri menjadi lisis (Alamsyah 2014)

Polifenol memiliki mekanisme sebagai antibakteri dengan mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga permeabilitas dinding dan membran sel bakteri naik sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim (Ajizah 2004 dan Juliantina *et al.* 2009).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa :

Pertama, berdasarkan uji difusi ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun kenikir memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis* ATCC 6633

Kedua, berdasarkan uji difusi fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 dengan konsentrasi 50% dengan daya hambat yang dihasilkan 21 mm.

Ketiga, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak metanol dan fraksi daun kenikir tidak dapat ditentukan. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat dari daun kenikir terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 adalah 6,25%.

B. Saran

Pertama, melakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap daun kenikir dengan menggunakan metode penyarian dan penggunaan pelarut yang berbeda.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui senyawa paling aktif yang ada diekstrak kenikir yang dapat membunuh *B. subtilis* ATCC 6633.

DAFTAR PUSTAKA

- Abas, F. dkk. (2003). Antioksidative and radical scavenging properties of the constituents isolated from *Cosmos caudatus* Kunth. *Nat. Prod. Sci.* 9:245-248.
- Ajizah, A., 2004. *Sensitivitas Salmonella Typhimurium terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L.* Bioscientiae Vol. 1 No.1. pp: 8-31
- Alamsyah HK, Widowati I, sabdono A. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut sargassum cinereum (J.G.Agardh) dari pulau panjang jepara terhadap bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus epidermis*. *Journal of Marine Research* 3:69-78.
- Alfarisi, S. 2009. Uji Mekanisme Penghambatan Antibakteri Minyak Atsiri Daun Sirih (*PiperBettle* Linn; Piperaceae) Terhadap *Staphylococcus Epidermis*. Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Jakarta.
- Aliero, A. A., Aliero, B.L. and Buhari, U. 2008. *Preliminary phytochemical and antibacterial screening of seadoxus multiflorus*. *International Journal of Pure and Applied Sciences. Int. Jor. P. App. Scs.* 2(4):13-17.
- Atsarina NWG, Astuti KW, Warditiani NK. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle. *Jurnal Farmasi Udayana* 2 : 1-6.
- Black, J. M. and E. M. Jacobs. 1993. *Medical Surgical Nursing*. 4th edition. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbial Rev* 12:568-582.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia.1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta : Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Hlm 1,4,7,10, 13-14.
- [DEPKES RI].2005. *Materia Medika Indonesia*. Jilid III. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 301-304.
- Dalimartha, Setiawan (2006). *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Jilid 4*. Puspa Swara. Jakarta. 73, 82, 83.
- Darmandi. 2008. 1001 Resep Herbal. Jakarta; Penebar Swadaya.Hlm 425-427.
- Doughari JH. 2012. Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. Di dalam: Rao V, editor. *Phytochemicals-A Global Prespective of their role in Nutrition and Health*. Kroasia.Hlm 6-8.


- Fardiaz, Srikandi. 2001. *Mikrobiologi Pangan*. Bogor. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor. hlm 190.
- Ganiswara, S.E. 1995. *Farmakologi dan Terapi Edisi IV*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Ganiswarna. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi V. Jakarta : Gaya Baru. Hlm.585-598.
- Guenther E. 1987. *Minyak Atsiri*. Jilid 1. Kateran S, penerjemah. Cetakan 1, penerbit Universitas Indonesia: Jakarta. Hlm 12,13.
- Harbone, J. B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB.
- Harborne, J. B. 1996. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan* Diterjemahkan oleh : K. Padmawinata dan I. Soediro. penerbit ITB, Bandung.
- Harborne JB. 2006. *Metode Fitokimia Penuntunan dan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Edisi III. Padmawinata K, Semarang : IKIP Semarang Press.
- Harborne, JB. 1987. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Ed ke-2. Kokasih P, Iwang S, penerjemah; Sofia N, editor. Bandung: ITB. Diterjemahkan dari : *Phytochemical Methods*. Hlm 7-8, 102,147. Diterjemahkan oleh : K. Padmawinata dan I. Soediro. penerbit ITB, Bandung.
- Harminta, R.M. 2004 *Analisa Hayati*. Jakarta : Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1986. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan*. Edisi XVI. Penerjemah : Bonang, G. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran.
- Jawetz, E., J.L., Adelberg, E. A., 1996, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi XXII, Diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jakarta, Penerbit Salemba Medika.
- Jawetz, Melnick, Adelberg. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Hartanto H, Rachman C, Dimanti A, Diani A, penerjemah ; Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran ECG. Terjemahan dari : *Medical Microbiology*.
- Juliantina, F., Citra, D.A., Nirwani, B., Nurmasitoh, T., Bowo, E.T. 2009. *Manfaat Sirih Merah (Piper crocatum) sebagai Agen Antibakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif*. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia* 1(1): 12-20.

- Khopkar SM. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Lay BW. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Jakarta : PT Raja Grafindo Persada.
- Ngajow M, Abidjulu J, Vanda SK. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia Pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro
- Lenny S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida, Alkaloid*. Medan: USU Respiratory.
- List P. H., P. C. Schmidt. 2000. *Phytopharmaceuticals Technology*. Alih bahasa : David Ellaby. Florida: CRC Press. Hlm. 67, 71-73.
- Mursyidi A. 1990. *Analisis Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Bioteknologi Universitas Gajah Mada. Hlm 63, 171, 175, 192, 209-210.
- Pramono S. 2013. *Teknologi Farmasetik (Proses Produksi Ekstrak untuk Sediaan Obat Alam)*, Bahan ajar Galenika. Yogyakarta : Universitas Gajah Mada.
- Putri, W.S., Warditiani, N.K., Larasanty, L.P.F. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). [Skripsi]. Fakultas Farmasi, Universitas Udayana, Bali.
- Rasdi, N. H. M., dkk. (2010). Antimicrobial Studies of *Cosmos caudatus* Kunth. (Compositae). Vol 4(8).
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi V. Padmawinata K, penerjemah ; Bandung: ITB.
- Sriyanti DP, Wijayani A. 2008. *Teknik Kultur Jaringan*. Cetakan ke-9. Yogyakarta : Penerbit Kanisus. hlm 86.
- Susanti A. 2015. Uji aktivitas ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, dan fraksi etil asetat daun *Artemisia californica* Less. Terhadap *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25953 secara invitro [skripsi]-Yogyakarta. Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada.
- Sutton, S. 2011. *Determination of Inoculum for Microbiological Testing*. Summer Vol. 15 Number 3.
- Talaro KP (2002). *Foundations in Microbiology* Fourth Edition. New York, McGraw Hill.
- Terjemah dari : *The Organic Constituents Of Higher Plants*. Hlm 190-20, 57, 154-155, 157, 164, 170-171, 191.

- Voight R.1989. Buku Pelajaran Tehnologi Farmasi. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Voigt R. 1995. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi, penerjemah; Soendani Noerono Soewandi. Ed ke-5 Yogyakarta: Gajah Mada University Press. Hlm 561, 564.
- Volk, W.A., dan Wheller, M.F. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Jilid II. Terjemahan Soenartomo Adisoemarto, Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Wahyu DI, Maya S, Eny Z. 2013. Pengaruh HgCl₂ terhadap Viabilitas Bacillus S1 dan Potensi Biodegradasi Limbah Organik 2:2-3.
- Waluyo L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang : Universitas Muhamadiyah Press.
- Wardhani, L. K. Dan N. Sulistyani. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera Scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 2 : 1-16.

LAMPJRAW

Lampiran 1. Surat Keterangan Determinasi Tanaman Kenikir

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

Nomor : 039/UN27.9.6.4/Lab/2017
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -

Nama Pemesan : Hanim Faudiyah
NIM : 19133921 A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

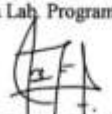

Nama Sampel : *Cosmos caudatus* Kunth
Familia : Asteraceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963, 1965) :


| | |
|---|------------------------------|
| 1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23a | 166. Asteraceae |
| 1b-3b-33b-41a-42a-43a-44b-45b-46b-47b-48b-49b-54b-55b-56b-57b-58b-59b | 69. <i>Cosmos</i> |
| 1b-2b-3a | <i>Cosmos caudatus</i> Kunth |

Deskripsi Tumbuhan :
Habitus : terna, menahun, tumbuh tegak, aromatis ketika diremas, tinggi 0.6-2.5 m. Akar : tunggang, bercabang, coklat kotor atau putih kotor atau putih kekuningan hingga putih susu. Batang : segiempat ketika muda dan bulat ketika dewasa, sedikit berkayu, sedikit bercabang, permukaan batang gundul hingga sedikit berambut dan beralur membujur, warna hijau. Daun : berhadapan, daun bagian bawah menyirip 3-4 atau berbagi menyirip 3-4 sedangkan daun bagian atas tidak terlalu berbagi, bertangkai panjang, helaian daun bentuk bulat telur memanjang, panjang 4-20 cm, lebar 3-15 cm, ujung runcing, tepi berbagi, pangkal runcing hingga tumpul, pertulangan daun menyirip, permukaan atas daun berwarna hijau tua, permukaan bawah daun berwarna hijau muda, gundul; anak daun berbentuk lanset hingga garis, lebar anak daun 2-8 mm, permukaan gundul; daun penumpu tidak ada. Bunga : majemuk bentuk bongkol (*capitulum*), terletak di ketiak daun atau ujung batang, dilindungi oleh daun pembalut (*involucrum*); daun pembalut (*involucrum*) bentuk lonceng, terdiri atas 8 helai, tersusun menyirip seperti genting, seringkali menghasilkan kelenjar dan lengket, warna hijau; dasar bunga (*receptaculum*) rata, dengan sisik-sisik seperti jerami; ibu tangkai bunga gundul hingga sedikit berambut, panjang 5-22 cm; bunga tepi 8, dalam satu lingkaran, berkelamin dua (banci), mahkota bunga berbentuk pita, memanjang hingga bulat telur terbalik dengan ujung bergigi 3, panjang 1-1.5 cm, lebar 0.5 cm, berwarna merah atau ungu; bunga tengah berjumlah banyak, berkelamin dua (banci), mahkota berbentuk tabung, tinggi 1 cm, bertaju 5, pucuk dengan ujung berwarna kuning, tabung kepala sari coklat kehitaman, tangkai putik bercabang 2, runcing, bagian luar berambut panjang. Buah : kering, keras, kotak silindris memanjang, panjang 1-3 cm, beralur dan berparuh 2-3, panjang paruh 1-1.5 mm, coklat kehitaman. Biji : kecil, pipih, warna hitam.

Surakarta, 1 Februari 2017

| | |
|--|--|
| <p>Kepala Lab. Program Studi Biologi</p>  Dr. Tetri Widiyanti, M.Si. NIP. 19711224 200003 2 001 | <p>Penanggungjawab Determinasi Tumbuhan</p>  Suratman, S.Si., M.Si. NIP. 19800705 200212 1 002 |
|--|--|

Menegetahui
Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS


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

Lampiran 2. Gambar daun dan serbuk daun kenikir

daun kenikir



Serbuk

Lampiran 3. Gambar inkubator, *Rotary evaporator* dan *Sterling-Bidwel*, corong pisah



Inkubator



Rotary evaporator







sterling-Bidwel







Corong pisah (fraksinasi)

Lampiran 4. Foto identifikasi kimia secara kualitatif dan uji bebas metanol

1. Ekstrak dan fraksi teraktif daun kenikir

| Senyawa | Ekstrak | fraksi teraktif (fraksi etil asetat) |
|-----------|---|--|
| Flavonoid |  |  |
| | + | + |
| Saponin |  |  |
| | + | + |

| | | | | |
|---------------|--|---|--|---|
| Minyak atsiri |  | |  | |
| | | + | | - |
| Polifenol |  | |  | |
| | | + | | + |

Keterangan :

1. Flavonoid

Ekstrak dan fraksi teraktif dilarutkan dalam metanol ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCL pekat. Hasil positif ditunjukkan warna jingga (Setyowati *et al.* 2014).

2. Saponin

Ekstrak dan fraksi teraktif ditambah 10 ml air panas, kemudian didinginkan lalu di kocok kuat-kuat selama 10 menit. Saponin positif terbentuk bila terbentuknya busa stabil (Setyowati *et al.* 2014)

3. Identifikasi Minyak Atsiri.

Ekstrak dan fraksi teraktif ditambahkan 1 tetes asam sulfat pekat kepada serbuk daun kenikir akan memberikan warna ungu (Gunawan & Mulyani 2004).

4. Polifenol

Ekstrak dan fraksi teraktif Sebanyak 0,5 gram kedalam tabung reaksi

kemudian ditambah 1 ml larutan FeCl_3 10%, lalu dikocok kuat sampai homogen. Jika terbentuk hitam kehijauan (Robinson 1995).

Uji bebas metanol



Keterangan :

1. Ekstrak ditambahkan asam asetat. Hasil positif sudah tidak terdapat bau ester (Praeparandi 2006).

Lampiran 5. Foto identifikasi kimia fraksi paling aktif secara KLT

Hasil identifikasi kimia fraksi paling aktif secara KLT dengan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄

1. Flavonoid

Fase gerak : Butanol – asam asetat – air (4 : 5 : 1)



a



b



c

keterangan :

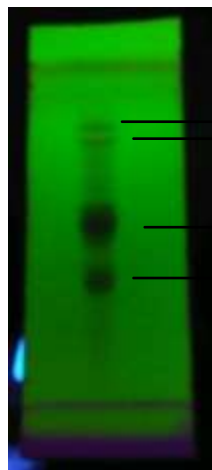
a = Hasil KLT pada sinar UV 254

b.= Hasil KLT pada sinar UV 366

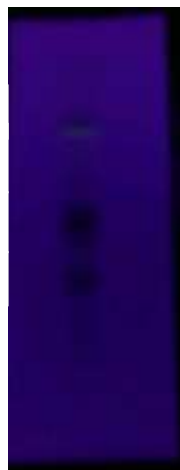
c. = Hasil KLT dengan pereaksi semprot sitroborat

2. Polifenol

Fase gerak : Etil asetat – asam formiat – toluene – air (6 : 1,5 : 3 : 0,5)



a



b



c

keterangan :

a = Hasil KLT pada sinar UV 254

b.= Hasil KLT pada sinar UV 366

c.= Hasil KLT dengan pereaksi semprot FeCl₃

Lampiran 6. Perhitungan Rf

$$Rf = \frac{\text{jarak bercak dari awal totolan}}{\text{jarak elusi}}$$

1. Rf polifenol

$$Rf_1 = \frac{1,5}{5,1} = 0,294$$

$$Rf_2 = \frac{2,4}{5,1} = 0,47$$

$$Rf_3 = \frac{3,7}{5,1} = 0,73$$

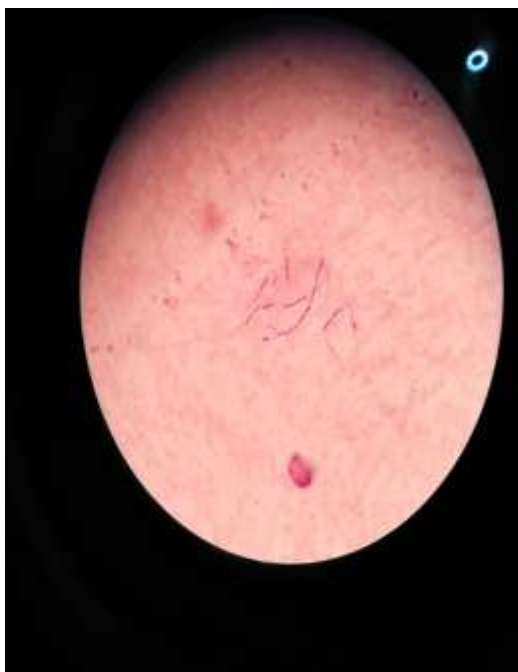
$$Rf_4 = \frac{4}{5,1} = 0,78$$

2. Rf flavonoid

$$Rf = \frac{4,2}{4,9} = 0,86$$

Lampiran 7. Foto suspensi bakteri uji dan identifikasi bakteri

Suspensi bakteri dan mc Farland

Uji identifikasi bakteri *B. subtilis* ATCC 6633

Uji pewarnaan Gram



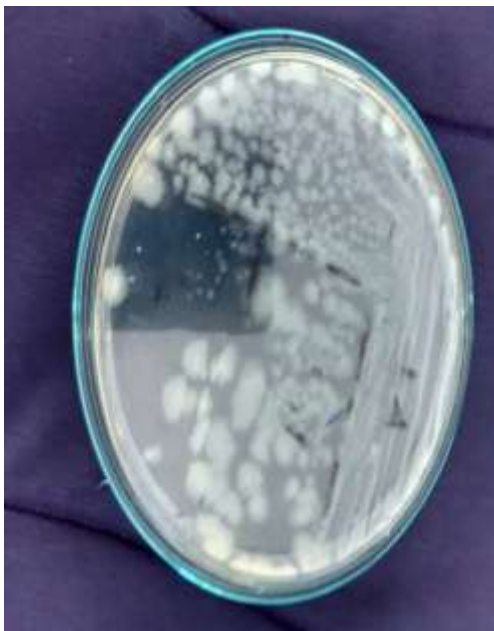
Uji pewarnaan Endospora dengan perbesaran 100x

Uji identifikasi bakteri *B. subtilis* ATCC 6633

Uji katalase



Uji amylase

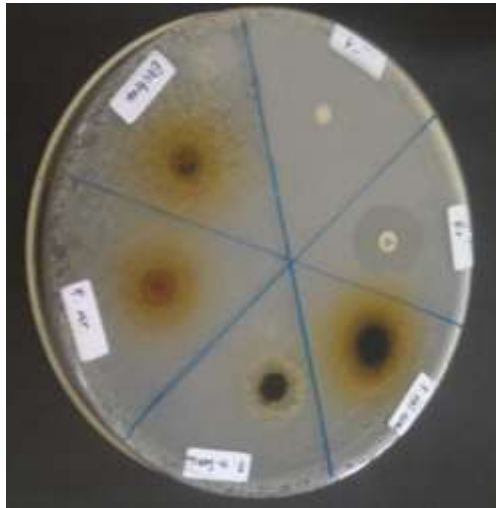
Uji identifikasi bakteri *B. subtilis* ATCC 6633Morfologi dari bakteri *B. subtilis*Bakteri *B. subtilis* pada media NA

Lampiran 8. Pengenceran Sediaan ekstrak dan fraksi dengan menggunakan DMSO 5%



Lampiran 9. Foto hasil uji difusi ekstrak metanol, fraksi n-heksana, etil asetat dan air terhadap *B. subtilis* ATCC 6633

Uji difusi dengan konsentrasi 50%

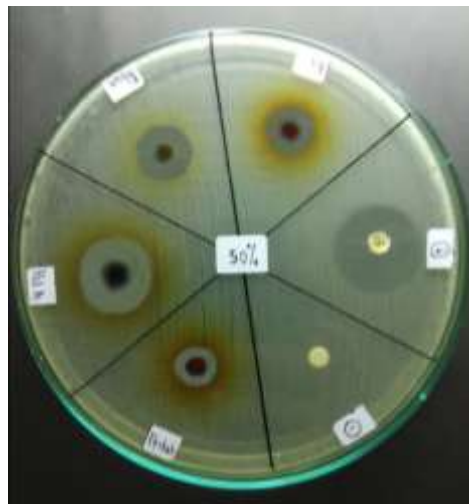


Replikasi 1



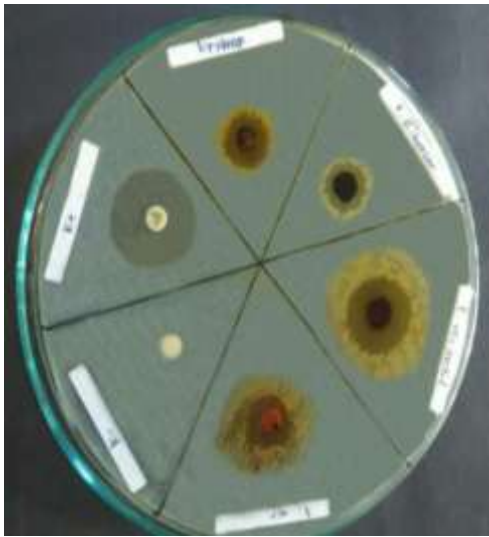
Replikasi 2

Uji difusi dengan konsentrasi 50%



Replikasi 3

Uji difusi dengan konsentrasi 25%

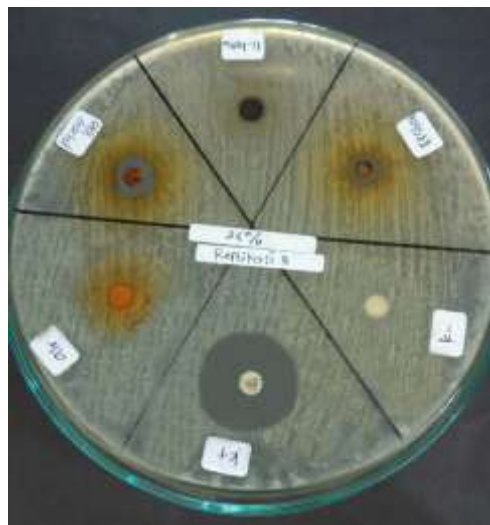


Replikasi 1



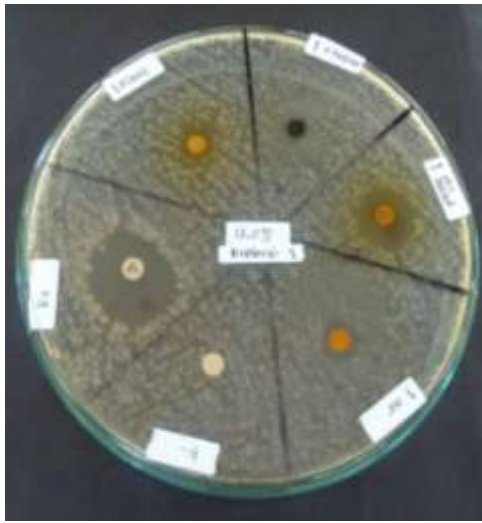
Replikasi 2

Uji difusi dengan konsentrasi 25%

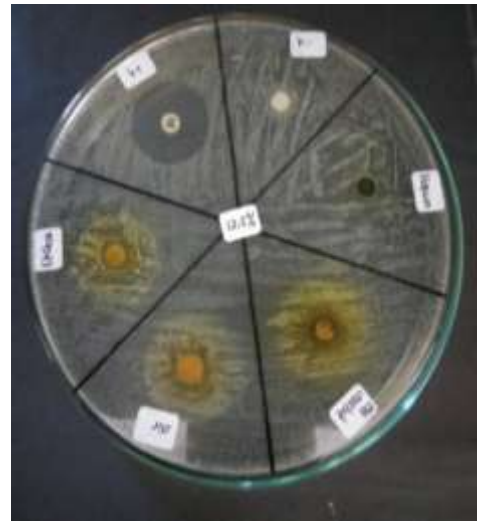


Replikasi 3

Uji difusi dengan konsentrasi 12,5 %

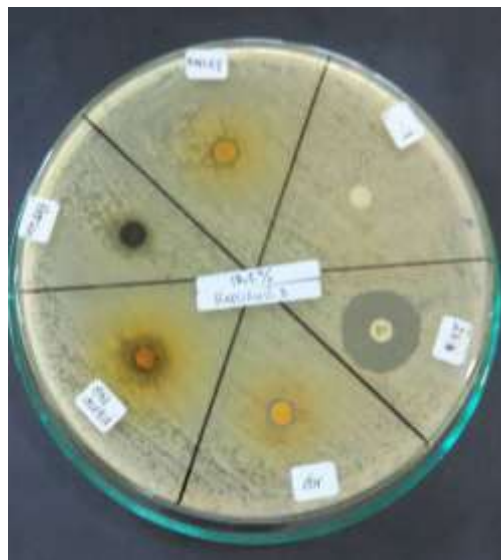


Replikasi 1



Replikasi 2

Uji difusi dengan konsentrasi 12,5%



Replikasi 3

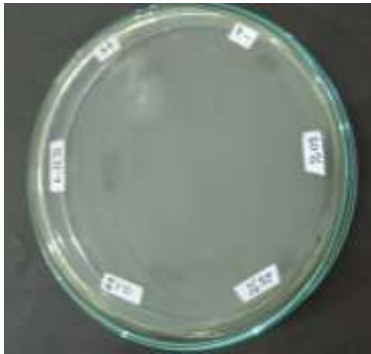
Lampiran 10. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun kenikir terhadap *B. subtilis* ATCC 6633

Replikasi 1 :

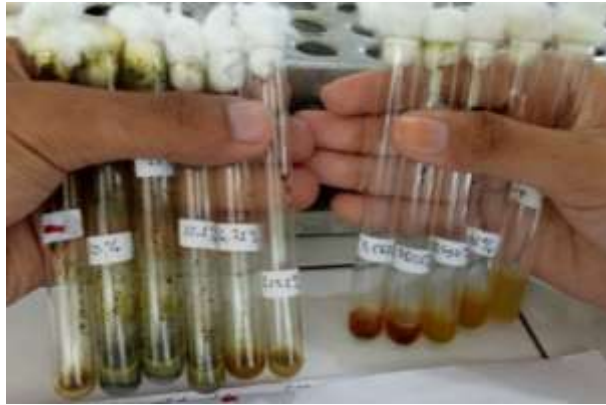


Hasil inokulasi bakteri *B.subtilis* pada media MHA

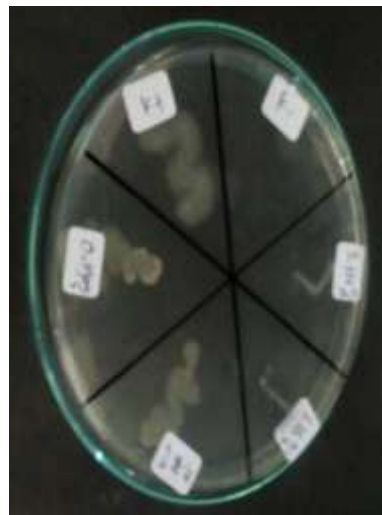
Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3



Lampiran 11. Perhitungan rendemen simplisia daun kenikir

| Bobot basah (g) | Bobot kering (g) | Rendemen (%) |
|-----------------|------------------|--------------|
| 8000 | 1200 | 11,25 |

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot kering}}{\text{Bobot basah}} \times 100 \%$$

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{1200}{8000} \times 100 \% = 15 \%$$

Lampiran 12. Perhitungan kadar air

| No | Penimbangan | Volume pada skala (ml) | Kadar air % |
|----|-------------|------------------------|-------------|
| 1 | 20 gram | 1,70 ml | 8,5% |
| 2 | 20 gram | 1,60 ml | 8 % |
| 3 | 20 gram | 1,60 ml | 8% |
| | | Rata-rata | 8,16 % |

Perhitungan :

$$\text{Prosentase kadar air} = \frac{\text{volume terbaca}}{\text{berat bahan}} \times 100 \%$$

$$\text{Prosentase kadar air I} = \frac{1,7}{20} \times 100 \% = 8,5 \%$$

$$\text{Prosentase kadar air II} = \frac{1,6}{20} \times 100 \% = 8 \%$$

$$\text{Prosentase kadar air III} = \frac{1,6}{20} \times 100 \% = 8 \%$$

Lampiran 13. Perhitungan rendemen ekstrak dan fraksi daun kenikir
Rendemen ekstrak maserasi daun kenikir

| Bahan sampel (g) | Bobot ekstrak (g) | Rendemen ekstrak (b/b%) |
|------------------|-------------------|-------------------------|
| 900 | 162,21 | 18,02 |

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

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{162,21}{900} \times 100 \% = 18,02 \%$$

Rendemen fraksinasi daun kenikir

| Pelarut | Bobot wadah + fraksi (g) | Bobot wadah kosong (g) | Bobot fraksi (g) | Rendemen (%) |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------|
| <i>n</i> -heksana | 91.96 | 80,7 | 11,26 | 18,77% |
| Etil asetat | 86.47 | 79,3 | 7,17 | 11,95% |
| Air | 93.22 | 81,8 | 11,42 | 19,03% |

Perhitungan rendemen fraksi yang dilakukan sebanyak 6 kali :

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot fraksi (g)}}{\text{Bobot ekstrak (g)}} \times 100 \%$$

Fraksi *n*-heksana

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{11,26 \text{ (g)}}{60 \text{ (g)}} \times 100 \% = 18,77\%$$

Fraksi etil asetat

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{7,17 \text{ (g)}}{60 \text{ (g)}} \times 100 \% = 11,95\%$$

Fraksi air

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{11,42 \text{ (g)}}{60 \text{ (g)}} \times 100 \% = 19,03\%$$

Lampiran 14. Perhitungan Pengenceran DMSO 5%

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

$$V_1 \cdot 100\% = 10\text{mL} \cdot 5\%$$

$$V_1 = \frac{50\%}{100\%}$$

$V_1=0,5$ ml ad 10 ml akuades

Lampiran 15. Pembuatan seri konsentrasi larutan uji metode difusi ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun kenikir

1. Konsentrasi 50%

Menimbang 2 gram ekstrak dilarutkan dalam DMSO 5% 4 ml

2. Konsentrasi 25%

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

$$V_1 \cdot 50\% = 1 \text{ mL} \cdot 25\%$$

$$V_1 = \frac{25\%}{50\%}$$

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

Dipipet 0,5 mL dari sediaan awal (50%) kemudian ditambah DMSO 5% ad 1 mL

3. Konsentrasi 12,5%

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

$$V_1 \cdot (25\%) = 1 \text{ ml} \cdot (12,5\%)$$

$$V_1 = \frac{12,5\%}{25\%}$$

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

Dipipet 0,5 mL dari sediaan (25%) kemudian ditambah DMSO 5% ad 1 ml

Lampiran 16. Perhitungan konsentrasi fraksi etil asetat secara dilusi

Perhitungan seri konsentrasi fraksi teraktif etil asetat daun kenikir adalah sebagai berikut :

Menimbang 2 gram fraksi etil asetat kemudian dimasukkan ke dalam vial 4 mL dengan DMSO 5% .

Tabung 1 = Kontrol (-) diisi fraksi etil asetat 0,5 mL konsentrasi 50%

Tabung 2 = 0,5 ml fraksi etil asetat konsentrasi 50 %

Tabung 3 = pembuatan konsentrasi 25%

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

$$V_1 \cdot (50\%) = 1 \text{ mL} \cdot (25\%)$$

$$V_1 = \frac{25\%}{50\%}$$

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

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

Tabung 4 pembuatan konsentrasi 12,5 %

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

$$V_1 \cdot (25\%) = 1 \text{ mL} \cdot (12,5\%)$$

$$V_1 = \frac{12,5\%}{25\%}$$

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

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

Tabung 5 pembuatan konsentarsi 6,25%

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

$$V_1 \cdot (12,5\%) = 1 \text{ mL} \cdot (6,25\%)$$

$$V_1 = \frac{6,25\%}{12,5\%}$$

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

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

Tabung 6 pembuatan konsentarsi 3,125%

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

$$V_1 \cdot (6,25\%) = 1 \text{ mL} \cdot (3,125\%)$$

$$V_1 = \frac{3,125\%}{6,25\%}$$

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

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

Tabung 7 pembuatan konsentarsi 1,56%

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

$$V_1 \cdot (3,125\%) = 1 \text{ mL} \cdot (1,56\%)$$

$$V_1 = \frac{1,56\%}{3,125\%}$$

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

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

Tabung 8 pembuatan konsentarsi 0,78%

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot (1,56\%) = 1 \text{ mL} \cdot (0,78\%)$$

$$V_1 = \frac{0,78\%}{1,56\%}$$

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

Dipipet 0,5 ml dari tabung 7 kemudian ditambah BHI sampai 1 ml

Tabung 9 pembuatan konsentarsi 0,39%

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

$$V_1 \cdot (0,78\%) = 1 \text{ mL} (0,39\%)$$

$$V_1 = \frac{0,39\%}{0,78\%}$$

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

Dipipet 0,5 ml dari tabung 8 kemudian ditambah BHI sampai 1 ml

Tabung 10 pembuatan konsentarsi 0,195%

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

$$V_1 \cdot (0,39\%) = 1 \text{ mL} (0,195\%)$$

$$V_1 = \frac{0,195\%}{0,39\%}$$

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

Dipipet 0,5 ml dari tabung 9 kemudian ditambah BHI sampai 1 ml
kemudian dipipet 0,5 ml dan dibuang

Tabung 11 = Kontrol (+) diisi suspensi bakteri 1 ml

Keterangan :

Tabung 2 sampai tabung 10 ditambahkan suspensi bakteri 0,5 ml

Lampiran 17. Formulasi dan pembuatan media

a. Formulasi dan pembuatan Natrium Agar (NA)

| | |
|---------------------------------------|--------------|
| Komposisi : ekstrak daging sapi | 3,0g |
| Pepton..... | 5,0g |
| Aquadest ml | 1000 ml |
| pH..... | 6,8 ± 0,2 ml |

Reagen tersebut diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, dituangkan dalam tabung reaksi steril, kemudian disterilkan dengan autoclaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

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

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

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam Aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

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

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Komposisi : Infus sapi..... | 300,0 g |
| Pepton | 17,5 g |
| Tepung | 1,5 g |
| Agar..... | 17,5g |
| Aquadest ad..... | 1000 ml |
| Ph | 7,3 ± 0,1 |

Reagen tersebut diatas dilarutkan dalam akuadest sebanyak 1000 ml. Dipanaskan sampai larut sempurna dituangkan dalam tabung reaksi steril, kemudian disterilkan dengan autoclaf pada suhu 120°C selama 15 menit.

d. Standart Mc. Farland

Suspensi Standart Mc. Farland adalah suspense yang menunjukkan konsentrasi kekeruhan bakteri sama dengan 10^8 CFU/ml

Komposisi :

Larutan Asam Sulfat1% b/v 9,5 ml

Larutan Barium klorida1,175% v/v 0,5 ml

Cara pembuatan :

Dicampur kedua larutan tersebut dalam tabung reaksi dikocok dan dihomogenkan. Apabila kekeruhan suspense bakteri uji adalah sama dengan kekeruhan suspensi standart, berarti konsentrasi suspensi bakteri adalah 10^8 CFU/ml (Bridson 1998).

Lampiran 18. Analisa data uji ANOVA antara ekstrak metanol, fraksi n-hesana, etil asetat dan air dengan konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% pada bakteri *B. subtilis* ATCC 6633

Descriptive Statistics

| | N | Mean | Std. Deviation | Minimum | Maximum |
|---------------|----|--------|----------------|---------|---------|
| Diameter (mm) | 42 | 12.974 | 6.2988 | .0 | 26.0 |

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | Diameter (mm) |
|----------------------------------|----------------|---------------|
| N | | 42 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | 12.974 |
| | Std. Deviation | 6.2988 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .100 |
| | Positive | .088 |
| | Negative | -.100 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | .648 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .795 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

Diameter (mm)

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Min | Max |
|--------------------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|------|------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| ekstrak 50% | 3 | 14.333 | .5774 | .3333 | 12.899 | 15.768 | 14.0 | 15.0 |
| ekstrak 25% | 3 | 12.500 | .5000 | .2887 | 11.258 | 13.742 | 12.0 | 13.0 |
| ekstrak 12,5% | 3 | 8.333 | .5774 | .3333 | 6.899 | 9.768 | 8.0 | 9.0 |
| fraksi n-heksana 50% | 3 | 15.333 | .5774 | .3333 | 13.899 | 16.768 | 15.0 | 16.0 |
| fraksi n-heksana 25% | 3 | 11.333 | 1.1547 | .6667 | 8.465 | 14.202 | 10.0 | 12.0 |
| fraksi n-heksana 12,5% | 3 | 9.000 | 1.0000 | .5774 | 6.516 | 11.484 | 8.0 | 10.0 |
| fraksi etil asetat 50% | 3 | 21.333 | .5774 | .3333 | 19.899 | 22.768 | 21.0 | 22.0 |
| fraksi etil asetat 25% | 3 | 17.667 | .5774 | .3333 | 16.232 | 19.101 | 17.0 | 18.0 |
| fraksi etil asetat 12,5% | 3 | 15.833 | .7638 | .4410 | 13.936 | 17.731 | 15.0 | 16.5 |
| fraksi air 50% | 3 | 14.000 | 1.0000 | .5774 | 11.516 | 16.484 | 13.0 | 15.0 |
| fraksi air 25% | 3 | 8.800 | .7211 | .4163 | 7.009 | 10.591 | 8.0 | 9.4 |
| fraksi air 12,5% | 3 | 7.167 | .2887 | .1667 | 6.450 | 7.884 | 7.0 | 7.5 |
| Amoksisilin | 3 | 26.000 | .0000 | .0000 | 26.000 | 26.000 | 26.0 | 26.0 |
| DMSO 5% | 3 | .000 | .0000 | .0000 | .000 | .000 | .0 | .0 |
| Total | 42 | 12.974 | 6.2988 | .9719 | 11.011 | 14.937 | .0 | 26.0 |

Test of Homogeneity of Variances

Diameter (mm)

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.909 | 13 | 28 | .074 |

ANOVA

Diameter (mm)

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 1613.808 | 13 | 124.139 | 270.007 | .000 |
| Within Groups | 12.873 | 28 | .460 | | |
| Total | 1626.681 | 41 | | | |

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter (mm)

| (I) perlakuan | (J) perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | | |
|---------------|---------------|--------------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|--------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | |
| Tukey HSD | ekstrak 50% | ekstrak 25% | 1.8333 | .5536 | .107 | -.193 | 3.860 |
| | | ekstrak 12,5% | 6.0000* | .5536 | .000 | 3.973 | 8.027 |
| | | fraksi n-heksana 50% | -1.0000 | .5536 | .856 | -3.027 | 1.027 |
| | | fraksi n-heksana 25% | 3.0000* | .5536 | .001 | .973 | 5.027 |
| | | fraksi n-heksana 12,5% | 5.3333* | .5536 | .000 | 3.307 | 7.360 |
| | | fraksi etil asetat 50% | -7.0000* | .5536 | .000 | -9.027 | -4.973 |
| | | fraksi etil asetat 25% | -3.3333* | .5536 | .000 | -5.360 | -1.307 |
| | | fraksi etil asetat 12,5% | -1.5000 | .5536 | .324 | -3.527 | .527 |
| | | fraksi air 50% | .3333 | .5536 | 1.000 | -1.693 | 2.360 |
| | | fraksi air 25% | 5.5333* | .5536 | .000 | 3.507 | 7.560 |
| | | fraksi air 12,5% | 7.1667* | .5536 | .000 | 5.140 | 9.193 |
| | | Amoksisilin | -11.6667* | .5536 | .000 | -13.693 | -9.640 |
| | | DMSO 5% | 14.3333* | .5536 | .000 | 12.307 | 16.360 |
| | ekstrak 25% | ekstrak 50% | -1.8333 | .5536 | .107 | -3.860 | .193 |
| | | ekstrak 12,5% | 4.1667* | .5536 | .000 | 2.140 | 6.193 |
| | | fraksi n-heksana 50% | -2.8333* | .5536 | .001 | -4.860 | -.807 |
| | | fraksi n-heksana 25% | 1.1667 | .5536 | .691 | -.860 | 3.193 |
| | | fraksi n-heksana 12,5% | 3.5000* | .5536 | .000 | 1.473 | 5.527 |
| | | fraksi etil asetat 50% | -8.8333* | .5536 | .000 | -10.860 | -6.807 |
| | | fraksi etil asetat 25% | -5.1667* | .5536 | .000 | -7.193 | -3.140 |

| | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-----------|-------|-------|---------|---------|
| | fraksi etil asetat 12,5% | -3.3333* | .5536 | .000 | -5.360 | -1.307 |
| | fraksi air 50% | -1.5000 | .5536 | .324 | -3.527 | .527 |
| | fraksi air 25% | 3.7000* | .5536 | .000 | 1.673 | 5.727 |
| | fraksi air 12,5% | 5.3333* | .5536 | .000 | 3.307 | 7.360 |
| | Amoksisilin | -13.5000* | .5536 | .000 | -15.527 | -11.473 |
| | DMSO 5% | 12.5000* | .5536 | .000 | 10.473 | 14.527 |
| ekstrak 12,5% | ekstrak 50% | -6.0000* | .5536 | .000 | -8.027 | -3.973 |
| | ekstrak 25% | -4.1667* | .5536 | .000 | -6.193 | -2.140 |
| | fraksi n-heksana 50% | -7.0000* | .5536 | .000 | -9.027 | -4.973 |
| | fraksi n-heksana 25% | -3.0000* | .5536 | .001 | -5.027 | -.973 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | -.6667 | .5536 | .993 | -2.693 | 1.360 |
| | fraksi etil asetat 50% | -13.0000* | .5536 | .000 | -15.027 | -10.973 |
| | fraksi etil asetat 25% | -9.3333* | .5536 | .000 | -11.360 | -7.307 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -7.5000* | .5536 | .000 | -9.527 | -5.473 |
| | fraksi air 50% | -5.6667* | .5536 | .000 | -7.693 | -3.640 |
| | fraksi air 25% | -.4667 | .5536 | 1.000 | -2.493 | 1.560 |
| | fraksi air 12,5% | 1.1667 | .5536 | .691 | -.860 | 3.193 |
| | Amoksisilin | -17.6667* | .5536 | .000 | -19.693 | -15.640 |
| | DMSO 5% | 8.3333* | .5536 | .000 | 6.307 | 10.360 |
| fraksi n-heksana 50% | ekstrak 50% | 1.0000 | .5536 | .856 | -1.027 | 3.027 |
| | ekstrak 25% | 2.8333* | .5536 | .001 | .807 | 4.860 |
| | ekstrak 12,5% | 7.0000* | .5536 | .000 | 4.973 | 9.027 |
| | fraksi n-heksana 25% | 4.0000* | .5536 | .000 | 1.973 | 6.027 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 6.3333* | .5536 | .000 | 4.307 | 8.360 |
| | fraksi etil asetat 50% | -6.0000* | .5536 | .000 | -8.027 | -3.973 |
| | fraksi etil asetat 25% | -2.3333* | .5536 | .013 | -4.360 | -.307 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -.5000 | .5536 | 1.000 | -2.527 | 1.527 |
| | fraksi air 50% | 1.3333 | .5536 | .499 | -.693 | 3.360 |
| | fraksi air 25% | 6.5333* | .5536 | .000 | 4.507 | 8.560 |
| | fraksi air 12,5% | 8.1667* | .5536 | .000 | 6.140 | 10.193 |
| | Amoksisilin | -10.6667* | .5536 | .000 | -12.693 | -8.640 |
| | DMSO 5% | 15.3333* | .5536 | .000 | 13.307 | 17.360 |
| fraksi n-heksana 25% | ekstrak 50% | -3.0000* | .5536 | .001 | -5.027 | -.973 |
| | ekstrak 25% | -1.1667 | .5536 | .691 | -3.193 | .860 |
| | ekstrak 12,5% | 3.0000* | .5536 | .001 | .973 | 5.027 |
| | fraksi n-heksana 50% | -4.0000* | .5536 | .000 | -6.027 | -1.973 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 2.3333* | .5536 | .013 | .307 | 4.360 |
| | fraksi etil asetat 50% | -10.0000* | .5536 | .000 | -12.027 | -7.973 |
| | fraksi etil asetat 25% | -6.3333* | .5536 | .000 | -8.360 | -4.307 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -4.5000* | .5536 | .000 | -6.527 | -2.473 |
| | fraksi air 50% | -2.6667* | .5536 | .003 | -4.693 | -.640 |

| | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------|-------------|---------|-------|---------|---------|
| | fraksi air 25% | 2.5333* | .5536 | .005 | .507 | 4.560 |
| | fraksi air 12,5% | 4.1667* | .5536 | .000 | 2.140 | 6.193 |
| | Amoksisilin | -14.6667* | .5536 | .000 | -16.693 | -12.640 |
| | DMSO 5% | 11.3333* | .5536 | .000 | 9.307 | 13.360 |
| fraksi n-heksana 12,5% | ekstrak 50% | -5.3333* | .5536 | .000 | -7.360 | -3.307 |
| | ekstrak 25% | -3.5000* | .5536 | .000 | -5.527 | -1.473 |
| | ekstrak 12,5% | .6667 | .5536 | .993 | -1.360 | 2.693 |
| | fraksi n-heksana 50% | -6.3333* | .5536 | .000 | -8.360 | -4.307 |
| | fraksi n-heksana 25% | -2.3333* | .5536 | .013 | -4.360 | -.307 |
| | fraksi etil asetat 50% | -12.3333* | .5536 | .000 | -14.360 | -10.307 |
| | fraksi etil asetat 25% | -8.6667* | .5536 | .000 | -10.693 | -6.640 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -6.8333* | .5536 | .000 | -8.860 | -4.807 |
| | fraksi air 50% | -5.0000* | .5536 | .000 | -7.027 | -2.973 |
| | fraksi air 25% | .2000 | .5536 | 1.000 | -1.827 | 2.227 |
| | fraksi air 12,5% | 1.8333 | .5536 | .107 | -.193 | 3.860 |
| | Amoksisilin | -17.0000* | .5536 | .000 | -19.027 | -14.973 |
| | DMSO 5% | 9.0000* | .5536 | .000 | 6.973 | 11.027 |
| | fraksi etil asetat 50% | ekstrak 50% | 7.0000* | .5536 | .000 | 4.973 |
| ekstrak 25% | | 8.8333* | .5536 | .000 | 6.807 | 10.860 |
| ekstrak 12,5% | | 13.0000* | .5536 | .000 | 10.973 | 15.027 |
| fraksi n-heksana 50% | | 6.0000* | .5536 | .000 | 3.973 | 8.027 |
| fraksi n-heksana 25% | | 10.0000* | .5536 | .000 | 7.973 | 12.027 |
| fraksi n-heksana 12,5% | | 12.3333* | .5536 | .000 | 10.307 | 14.360 |
| fraksi etil asetat 25% | | 3.6667* | .5536 | .000 | 1.640 | 5.693 |
| fraksi etil asetat 12,5% | | 5.5000* | .5536 | .000 | 3.473 | 7.527 |
| fraksi air 50% | | 7.3333* | .5536 | .000 | 5.307 | 9.360 |
| fraksi air 25% | | 12.5333* | .5536 | .000 | 10.507 | 14.560 |
| fraksi air 12,5% | | 14.1667* | .5536 | .000 | 12.140 | 16.193 |
| Amoksisilin | | -4.6667* | .5536 | .000 | -6.693 | -2.640 |
| DMSO 5% | | 21.3333* | .5536 | .000 | 19.307 | 23.360 |
| fraksi etil asetat 25% | | ekstrak 50% | 3.3333* | .5536 | .000 | 1.307 |
| | ekstrak 25% | 5.1667* | .5536 | .000 | 3.140 | 7.193 |
| | ekstrak 12,5% | 9.3333* | .5536 | .000 | 7.307 | 11.360 |
| | fraksi n-heksana 50% | 2.3333* | .5536 | .013 | .307 | 4.360 |
| | fraksi n-heksana 25% | 6.3333* | .5536 | .000 | 4.307 | 8.360 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 8.6667* | .5536 | .000 | 6.640 | 10.693 |
| | fraksi etil asetat 50% | -3.6667* | .5536 | .000 | -5.693 | -1.640 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | 1.8333 | .5536 | .107 | -.193 | 3.860 |
| | fraksi air 50% | 3.6667* | .5536 | .000 | 1.640 | 5.693 |
| | fraksi air 25% | 8.8667* | .5536 | .000 | 6.840 | 10.893 |
| | fraksi air 12,5% | 10.5000* | .5536 | .000 | 8.473 | 12.527 |

| | | | | | | | |
|-----------------------------|--------------------------|-------------|-----------|-------|---------|---------|---------|
| | Amoksisilin | -8.3333* | .5536 | .000 | -10.360 | -6.307 | |
| | DMSO 5% | 17.6667* | .5536 | .000 | 15.640 | 19.693 | |
| fraksi etil asetat 12,5% | ekstrak 50% | 1.5000 | .5536 | .324 | -.527 | 3.527 | |
| | ekstrak 25% | 3.3333* | .5536 | .000 | 1.307 | 5.360 | |
| | ekstrak 12,5% | 7.5000* | .5536 | .000 | 5.473 | 9.527 | |
| | fraksi n-heksana 50% | .5000 | .5536 | 1.000 | -1.527 | 2.527 | |
| | fraksi n-heksana 25% | 4.5000* | .5536 | .000 | 2.473 | 6.527 | |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 6.8333* | .5536 | .000 | 4.807 | 8.860 | |
| | fraksi etil asetat 50% | -5.5000* | .5536 | .000 | -7.527 | -3.473 | |
| | fraksi etil asetat 25% | -1.8333 | .5536 | .107 | -3.860 | .193 | |
| | fraksi air 50% | 1.8333 | .5536 | .107 | -.193 | 3.860 | |
| | fraksi air 25% | 7.0333* | .5536 | .000 | 5.007 | 9.060 | |
| | fraksi air 12,5% | 8.6667* | .5536 | .000 | 6.640 | 10.693 | |
| | | Amoksisilin | -10.1667* | .5536 | .000 | -12.193 | -8.140 |
| | | DMSO 5% | 15.8333* | .5536 | .000 | 13.807 | 17.860 |
| | fraksi air 50% | ekstrak 50% | -.3333 | .5536 | 1.000 | -2.360 | 1.693 |
| ekstrak 25% | | 1.5000 | .5536 | .324 | -.527 | 3.527 | |
| ekstrak 12,5% | | 5.6667* | .5536 | .000 | 3.640 | 7.693 | |
| fraksi n-heksana 50% | | -1.3333 | .5536 | .499 | -3.360 | .693 | |
| fraksi n-heksana 25% | | 2.6667* | .5536 | .003 | .640 | 4.693 | |
| fraksi n-heksana 12,5% | | 5.0000* | .5536 | .000 | 2.973 | 7.027 | |
| fraksi etil asetat 50% | | -7.3333* | .5536 | .000 | -9.360 | -5.307 | |
| fraksi etil asetat 25% | | -3.6667* | .5536 | .000 | -5.693 | -1.640 | |
| fraksi etil asetat 12,5% | | -1.8333 | .5536 | .107 | -3.860 | .193 | |
| fraksi air 25% | | 5.2000* | .5536 | .000 | 3.173 | 7.227 | |
| fraksi air 12,5% | | 6.8333* | .5536 | .000 | 4.807 | 8.860 | |
| | | Amoksisilin | -12.0000* | .5536 | .000 | -14.027 | -9.973 |
| | | DMSO 5% | 14.0000* | .5536 | .000 | 11.973 | 16.027 |
| fraksi air 25% | | ekstrak 50% | -5.5333* | .5536 | .000 | -7.560 | -3.507 |
| | ekstrak 25% | -3.7000* | .5536 | .000 | -5.727 | -1.673 | |
| | ekstrak 12,5% | .4667 | .5536 | 1.000 | -1.560 | 2.493 | |
| | fraksi n-heksana 50% | -6.5333* | .5536 | .000 | -8.560 | -4.507 | |
| | fraksi n-heksana 25% | -2.5333* | .5536 | .005 | -4.560 | -.507 | |
| | fraksi n-heksana 12,5% | -.2000 | .5536 | 1.000 | -2.227 | 1.827 | |
| | fraksi etil asetat 50% | -12.5333* | .5536 | .000 | -14.560 | -10.507 | |
| | fraksi etil asetat 25% | -8.8667* | .5536 | .000 | -10.893 | -6.840 | |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -7.0333* | .5536 | .000 | -9.060 | -5.007 | |
| | fraksi air 50% | -5.2000* | .5536 | .000 | -7.227 | -3.173 | |
| | fraksi air 12,5% | 1.6333 | .5536 | .215 | -.393 | 3.660 | |
| | | Amoksisilin | -17.2000* | .5536 | .000 | -19.227 | -15.173 |
| | | DMSO 5% | 8.8000* | .5536 | .000 | 6.773 | 10.827 |

| | | | | | | |
|---------------------|--------------------------|-----------|-------|------|---------|---------|
| fraksi air 12,5% | ekstrak 50% | -7.1667* | .5536 | .000 | -9.193 | -5.140 |
| | ekstrak 25% | -5.3333* | .5536 | .000 | -7.360 | -3.307 |
| | ekstrak 12,5% | -1.1667 | .5536 | .691 | -3.193 | .860 |
| | fraksi n-heksana 50% | -8.1667* | .5536 | .000 | -10.193 | -6.140 |
| | fraksi n-heksana 25% | -4.1667* | .5536 | .000 | -6.193 | -2.140 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | -1.8333 | .5536 | .107 | -3.860 | .193 |
| | fraksi etil asetat 50% | -14.1667* | .5536 | .000 | -16.193 | -12.140 |
| | fraksi etil asetat 25% | -10.5000* | .5536 | .000 | -12.527 | -8.473 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -8.6667* | .5536 | .000 | -10.693 | -6.640 |
| | fraksi air 50% | -6.8333* | .5536 | .000 | -8.860 | -4.807 |
| | fraksi air 25% | -1.6333 | .5536 | .215 | -3.660 | .393 |
| | Amoksisilin | -18.8333* | .5536 | .000 | -20.860 | -16.807 |
| | DMSO 5% | 7.1667* | .5536 | .000 | 5.140 | 9.193 |
| amoksisilin | ekstrak 50% | 11.6667* | .5536 | .000 | 9.640 | 13.693 |
| | ekstrak 25% | 13.5000* | .5536 | .000 | 11.473 | 15.527 |
| | ekstrak 12,5% | 17.6667* | .5536 | .000 | 15.640 | 19.693 |
| | fraksi n-heksana 50% | 10.6667* | .5536 | .000 | 8.640 | 12.693 |
| | fraksi n-heksana 25% | 14.6667* | .5536 | .000 | 12.640 | 16.693 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 17.0000* | .5536 | .000 | 14.973 | 19.027 |
| | fraksi etil asetat 50% | 4.6667* | .5536 | .000 | 2.640 | 6.693 |
| | fraksi etil asetat 25% | 8.3333* | .5536 | .000 | 6.307 | 10.360 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | 10.1667* | .5536 | .000 | 8.140 | 12.193 |
| | fraksi air 50% | 12.0000* | .5536 | .000 | 9.973 | 14.027 |
| | fraksi air 25% | 17.2000* | .5536 | .000 | 15.173 | 19.227 |
| | fraksi air 12,5% | 18.8333* | .5536 | .000 | 16.807 | 20.860 |
| | DMSO 5% | 26.0000* | .5536 | .000 | 23.973 | 28.027 |
| DMSO 5% | ekstrak 50% | -14.3333* | .5536 | .000 | -16.360 | -12.307 |
| | ekstrak 25% | -12.5000* | .5536 | .000 | -14.527 | -10.473 |
| | ekstrak 12,5% | -8.3333* | .5536 | .000 | -10.360 | -6.307 |
| | fraksi n-heksana 50% | -15.3333* | .5536 | .000 | -17.360 | -13.307 |
| | fraksi n-heksana 25% | -11.3333* | .5536 | .000 | -13.360 | -9.307 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | -9.0000* | .5536 | .000 | -11.027 | -6.973 |
| | fraksi etil asetat 50% | -21.3333* | .5536 | .000 | -23.360 | -19.307 |
| | fraksi etil asetat 25% | -17.6667* | .5536 | .000 | -19.693 | -15.640 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -15.8333* | .5536 | .000 | -17.860 | -13.807 |
| | fraksi air 50% | -14.0000* | .5536 | .000 | -16.027 | -11.973 |
| | fraksi air 25% | -8.8000* | .5536 | .000 | -10.827 | -6.773 |
| | fraksi air 12,5% | -7.1667* | .5536 | .000 | -9.193 | -5.140 |
| | amoksisilin | -26.0000* | .5536 | .000 | -28.027 | -23.973 |
| Bonferroni | ekstrak 50% | 1.8333 | .5536 | .233 | -3.26 | 3.992 |
| | ekstrak 12,5% | 6.0000* | .5536 | .000 | 3.841 | 8.159 |

| | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-----------|-------|-------|---------|---------|
| | fraksi n-heksana 50% | -1.0000 | .5536 | 1.000 | -3.159 | 1.159 |
| | fraksi n-heksana 25% | 3.0000* | .5536 | .001 | .841 | 5.159 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 5.3333* | .5536 | .000 | 3.174 | 7.492 |
| | fraksi etil asetat 50% | -7.0000* | .5536 | .000 | -9.159 | -4.841 |
| | fraksi etil asetat 25% | -3.3333* | .5536 | .000 | -5.492 | -1.174 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -1.5000 | .5536 | 1.000 | -3.659 | .659 |
| | fraksi air 50% | .3333 | .5536 | 1.000 | -1.826 | 2.492 |
| | fraksi air 25% | 5.5333* | .5536 | .000 | 3.374 | 7.692 |
| | fraksi air 12,5% | 7.1667* | .5536 | .000 | 5.008 | 9.326 |
| | amoksisilin | -11.6667* | .5536 | .000 | -13.826 | -9.508 |
| | DMSO 5% | 14.3333* | .5536 | .000 | 12.174 | 16.492 |
| ekstrak 25% | ekstrak 50% | -1.8333 | .5536 | .233 | -3.992 | .326 |
| | ekstrak 12,5% | 4.1667* | .5536 | .000 | 2.008 | 6.326 |
| | fraksi n-heksana 50% | -2.8333* | .5536 | .002 | -4.992 | -.674 |
| | fraksi n-heksana 25% | 1.1667 | .5536 | 1.000 | -.992 | 3.326 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 3.5000* | .5536 | .000 | 1.341 | 5.659 |
| | fraksi etil asetat 50% | -8.8333* | .5536 | .000 | -10.992 | -6.674 |
| | fraksi etil asetat 25% | -5.1667* | .5536 | .000 | -7.326 | -3.008 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -3.3333* | .5536 | .000 | -5.492 | -1.174 |
| | fraksi air 50% | -1.5000 | .5536 | 1.000 | -3.659 | .659 |
| | fraksi air 25% | 3.7000* | .5536 | .000 | 1.541 | 5.859 |
| | fraksi air 12,5% | 5.3333* | .5536 | .000 | 3.174 | 7.492 |
| | amoksisilin | -13.5000* | .5536 | .000 | -15.659 | -11.341 |
| | DMSO 5% | 12.5000* | .5536 | .000 | 10.341 | 14.659 |
| ekstrak 12,5% | ekstrak 50% | -6.0000* | .5536 | .000 | -8.159 | -3.841 |
| | ekstrak 25% | -4.1667* | .5536 | .000 | -6.326 | -2.008 |
| | fraksi n-heksana 50% | -7.0000* | .5536 | .000 | -9.159 | -4.841 |
| | fraksi n-heksana 25% | -3.0000* | .5536 | .001 | -5.159 | -.841 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | -.6667 | .5536 | 1.000 | -2.826 | 1.492 |
| | fraksi etil asetat 50% | -13.0000* | .5536 | .000 | -15.159 | -10.841 |
| | fraksi etil asetat 25% | -9.3333* | .5536 | .000 | -11.492 | -7.174 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -7.5000* | .5536 | .000 | -9.659 | -5.341 |
| | fraksi air 50% | -5.6667* | .5536 | .000 | -7.826 | -3.508 |
| | fraksi air 25% | -.4667 | .5536 | 1.000 | -2.626 | 1.692 |
| | fraksi air 12,5% | 1.1667 | .5536 | 1.000 | -.992 | 3.326 |
| | amoksisilin | -17.6667* | .5536 | .000 | -19.826 | -15.508 |
| | DMSO 5% | 8.3333* | .5536 | .000 | 6.174 | 10.492 |
| fraksi n-heksana 50% | ekstrak 50% | 1.0000 | .5536 | 1.000 | -1.159 | 3.159 |
| | ekstrak 25% | 2.8333* | .5536 | .002 | .674 | 4.992 |
| | ekstrak 12,5% | 7.0000* | .5536 | .000 | 4.841 | 9.159 |
| | fraksi n-heksana 25% | 4.0000* | .5536 | .000 | 1.841 | 6.159 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 6.3333* | .5536 | .000 | 4.174 | 8.492 |
| | fraksi etil asetat 50% | -6.0000* | .5536 | .000 | -8.159 | -3.841 |
| | fraksi etil asetat 25% | -2.3333* | .5536 | .021 | -4.492 | -.174 |

| | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|-------------|----------|-------|---------|---------|
| | fraksi etil asetat 12,5% | -5.000 | .5536 | 1.000 | -2.659 | 1.659 |
| | fraksi air 50% | 1.3333 | .5536 | 1.000 | -826 | 3.492 |
| | fraksi air 25% | 6.5333* | .5536 | .000 | 4.374 | 8.692 |
| | fraksi air 12,5% | 8.1667* | .5536 | .000 | 6.008 | 10.326 |
| | amoksisilin | -10.6667* | .5536 | .000 | -12.826 | -8.508 |
| | DMSO 5% | 15.3333* | .5536 | .000 | 13.174 | 17.492 |
| fraksi n-heksana 25% | ekstrak 50% | -3.0000* | .5536 | .001 | -5.159 | -841 |
| | ekstrak 25% | -1.1667 | .5536 | 1.000 | -3.326 | .992 |
| | ekstrak 12,5% | 3.0000* | .5536 | .001 | .841 | 5.159 |
| | fraksi n-heksana 50% | -4.0000* | .5536 | .000 | -6.159 | -1.841 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 2.3333* | .5536 | .021 | .174 | 4.492 |
| | fraksi etil asetat 50% | -10.0000* | .5536 | .000 | -12.159 | -7.841 |
| | fraksi etil asetat 25% | -6.3333* | .5536 | .000 | -8.492 | -4.174 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -4.5000* | .5536 | .000 | -6.659 | -2.341 |
| | fraksi air 50% | -2.6667* | .5536 | .004 | -4.826 | -.508 |
| | fraksi air 25% | 2.5333* | .5536 | .008 | .374 | 4.692 |
| | fraksi air 12,5% | 4.1667* | .5536 | .000 | 2.008 | 6.326 |
| | amoksisilin | -14.6667* | .5536 | .000 | -16.826 | -12.508 |
| | DMSO 5% | 11.3333* | .5536 | .000 | 9.174 | 13.492 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | ekstrak 50% | -5.3333* | .5536 | .000 | -7.492 |
| ekstrak 25% | | -3.5000* | .5536 | .000 | -5.659 | -1.341 |
| ekstrak 12,5% | | .6667 | .5536 | 1.000 | -1.492 | 2.826 |
| fraksi n-heksana 50% | | -6.3333* | .5536 | .000 | -8.492 | -4.174 |
| fraksi n-heksana 25% | | -2.3333* | .5536 | .021 | -4.492 | -.174 |
| fraksi etil asetat 50% | | -12.3333* | .5536 | .000 | -14.492 | -10.174 |
| fraksi etil asetat 25% | | -8.6667* | .5536 | .000 | -10.826 | -6.508 |
| fraksi etil asetat 12,5% | | -6.8333* | .5536 | .000 | -8.992 | -4.674 |
| fraksi air 50% | | -5.0000* | .5536 | .000 | -7.159 | -2.841 |
| fraksi air 25% | | .2000 | .5536 | 1.000 | -1.959 | 2.359 |
| fraksi air 12,5% | | 1.8333 | .5536 | .233 | -.326 | 3.992 |
| amoksisilin | | -17.0000* | .5536 | .000 | -19.159 | -14.841 |
| DMSO 5% | | 9.0000* | .5536 | .000 | 6.841 | 11.159 |
| fraksi etil asetat 50% | | ekstrak 50% | 7.0000* | .5536 | .000 | 4.841 |
| | ekstrak 25% | 8.8333* | .5536 | .000 | 6.674 | 10.992 |
| | ekstrak 12,5% | 13.0000* | .5536 | .000 | 10.841 | 15.159 |
| | fraksi n-heksana 50% | 6.0000* | .5536 | .000 | 3.841 | 8.159 |
| | fraksi n-heksana 25% | 10.0000* | .5536 | .000 | 7.841 | 12.159 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 12.3333* | .5536 | .000 | 10.174 | 14.492 |
| | fraksi etil asetat 25% | 3.6667* | .5536 | .000 | 1.508 | 5.826 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | 5.5000* | .5536 | .000 | 3.341 | 7.659 |
| | fraksi air 50% | 7.3333* | .5536 | .000 | 5.174 | 9.492 |
| | fraksi air 25% | 12.5333* | .5536 | .000 | 10.374 | 14.692 |
| | fraksi air 12,5% | 14.1667* | .5536 | .000 | 12.008 | 16.326 |
| | amoksisilin | -4.6667* | .5536 | .000 | -6.826 | -2.508 |

| | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|-------------|----------|-------|---------|--------|
| | DMSO 5% | 21.3333* | .5536 | .000 | 19.174 | 23.492 |
| fraksi etil asetat 25% | ekstrak 50% | 3.3333* | .5536 | .000 | 1.174 | 5.492 |
| | ekstrak 25% | 5.1667* | .5536 | .000 | 3.008 | 7.326 |
| | ekstrak 12,5% | 9.3333* | .5536 | .000 | 7.174 | 11.492 |
| | fraksi n-heksana 50% | 2.3333* | .5536 | .021 | .174 | 4.492 |
| | fraksi n-heksana 25% | 6.3333* | .5536 | .000 | 4.174 | 8.492 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 8.6667* | .5536 | .000 | 6.508 | 10.826 |
| | fraksi etil asetat 50% | -3.6667* | .5536 | .000 | -5.826 | -1.508 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | 1.8333 | .5536 | .233 | -.326 | 3.992 |
| | fraksi air 50% | 3.6667* | .5536 | .000 | 1.508 | 5.826 |
| | fraksi air 25% | 8.8667* | .5536 | .000 | 6.708 | 11.026 |
| | fraksi air 12,5% | 10.5000* | .5536 | .000 | 8.341 | 12.659 |
| | amoksisilin | -8.3333* | .5536 | .000 | -10.492 | -6.174 |
| | DMSO 5% | 17.6667* | .5536 | .000 | 15.508 | 19.826 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | ekstrak 50% | 1.5000 | .5536 | 1.000 | -.659 |
| ekstrak 25% | | 3.3333* | .5536 | .000 | 1.174 | 5.492 |
| ekstrak 12,5% | | 7.5000* | .5536 | .000 | 5.341 | 9.659 |
| fraksi n-heksana 50% | | .5000 | .5536 | 1.000 | -1.659 | 2.659 |
| fraksi n-heksana 25% | | 4.5000* | .5536 | .000 | 2.341 | 6.659 |
| fraksi n-heksana 12,5% | | 6.8333* | .5536 | .000 | 4.674 | 8.992 |
| fraksi etil asetat 50% | | -5.5000* | .5536 | .000 | -7.659 | -3.341 |
| fraksi etil asetat 25% | | -1.8333 | .5536 | .233 | -3.992 | .326 |
| fraksi air 50% | | 1.8333 | .5536 | .233 | -.326 | 3.992 |
| fraksi air 25% | | 7.0333* | .5536 | .000 | 4.874 | 9.192 |
| fraksi air 12,5% | | 8.6667* | .5536 | .000 | 6.508 | 10.826 |
| Amoksisilin | | -10.1667* | .5536 | .000 | -12.326 | -8.008 |
| DMSO 5% | | 15.8333* | .5536 | .000 | 13.674 | 17.992 |
| fraksi air 50% | | ekstrak 50% | -.3333 | .5536 | 1.000 | -2.492 |
| | ekstrak 25% | 1.5000 | .5536 | 1.000 | -.659 | 3.659 |
| | ekstrak 12,5% | 5.6667* | .5536 | .000 | 3.508 | 7.826 |
| | fraksi n-heksana 50% | -1.3333 | .5536 | 1.000 | -3.492 | .826 |
| | fraksi n-heksana 25% | 2.6667* | .5536 | .004 | .508 | 4.826 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 5.0000* | .5536 | .000 | 2.841 | 7.159 |
| | fraksi etil asetat 50% | -7.3333* | .5536 | .000 | -9.492 | -5.174 |
| | fraksi etil asetat 25% | -3.6667* | .5536 | .000 | -5.826 | -1.508 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -1.8333 | .5536 | .233 | -3.992 | .326 |
| | fraksi air 25% | 5.2000* | .5536 | .000 | 3.041 | 7.359 |
| | fraksi air 12,5% | 6.8333* | .5536 | .000 | 4.674 | 8.992 |
| | Amoksisilin | -12.0000* | .5536 | .000 | -14.159 | -9.841 |
| | DMSO 5% | 14.0000* | .5536 | .000 | 11.841 | 16.159 |
| | fraksi air 25% | ekstrak 50% | -5.5333* | .5536 | .000 | -7.692 |
| ekstrak 25% | | -3.7000* | .5536 | .000 | -5.859 | -1.541 |
| ekstrak 12,5% | | .4667 | .5536 | 1.000 | -1.692 | 2.626 |
| fraksi n-heksana 50% | | -6.5333* | .5536 | .000 | -8.692 | -4.374 |

| | | | | | | |
|---------------------|--------------------------|-----------|-------|-------|---------|---------|
| | fraksi n-heksana 25% | -2.5333* | .5536 | .008 | -4.692 | -.374 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | -.2000 | .5536 | 1.000 | -2.359 | 1.959 |
| | fraksi etil asetat 50% | -12.5333* | .5536 | .000 | -14.692 | -10.374 |
| | fraksi etil asetat 25% | -8.8667* | .5536 | .000 | -11.026 | -6.708 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -7.0333* | .5536 | .000 | -9.192 | -4.874 |
| | fraksi air 50% | -5.2000* | .5536 | .000 | -7.359 | -3.041 |
| | fraksi air 12,5% | 1.6333 | .5536 | .578 | -.526 | 3.792 |
| | Amoksisilin | -17.2000* | .5536 | .000 | -19.359 | -15.041 |
| | DMSO 5% | 8.8000* | .5536 | .000 | 6.641 | 10.959 |
| fraksi air 12,5% | ekstrak 50% | -7.1667* | .5536 | .000 | -9.326 | -5.008 |
| | ekstrak 25% | -5.3333* | .5536 | .000 | -7.492 | -3.174 |
| | ekstrak 12,5% | -1.1667 | .5536 | 1.000 | -3.326 | .992 |
| | fraksi n-heksana 50% | -8.1667* | .5536 | .000 | -10.326 | -6.008 |
| | fraksi n-heksana 25% | -4.1667* | .5536 | .000 | -6.326 | -2.008 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | -1.8333 | .5536 | .233 | -3.992 | .326 |
| | fraksi etil asetat 50% | -14.1667* | .5536 | .000 | -16.326 | -12.008 |
| | fraksi etil asetat 25% | -10.5000* | .5536 | .000 | -12.659 | -8.341 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -8.6667* | .5536 | .000 | -10.826 | -6.508 |
| | fraksi air 50% | -6.8333* | .5536 | .000 | -8.992 | -4.674 |
| | fraksi air 25% | -1.6333 | .5536 | .578 | -3.792 | .526 |
| | Amoksisilin | -18.8333* | .5536 | .000 | -20.992 | -16.674 |
| | DMSO 5% | 7.1667* | .5536 | .000 | 5.008 | 9.326 |
| amoksisilin | ekstrak 50% | 11.6667* | .5536 | .000 | 9.508 | 13.826 |
| | ekstrak 25% | 13.5000* | .5536 | .000 | 11.341 | 15.659 |
| | ekstrak 12,5% | 17.6667* | .5536 | .000 | 15.508 | 19.826 |
| | fraksi n-heksana 50% | 10.6667* | .5536 | .000 | 8.508 | 12.826 |
| | fraksi n-heksana 25% | 14.6667* | .5536 | .000 | 12.508 | 16.826 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | 17.0000* | .5536 | .000 | 14.841 | 19.159 |
| | fraksi etil asetat 50% | 4.6667* | .5536 | .000 | 2.508 | 6.826 |
| | fraksi etil asetat 25% | 8.3333* | .5536 | .000 | 6.174 | 10.492 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | 10.1667* | .5536 | .000 | 8.008 | 12.326 |
| | fraksi air 50% | 12.0000* | .5536 | .000 | 9.841 | 14.159 |
| | fraksi air 25% | 17.2000* | .5536 | .000 | 15.041 | 19.359 |
| | fraksi air 12,5% | 18.8333* | .5536 | .000 | 16.674 | 20.992 |
| | DMSO 5% | 26.0000* | .5536 | .000 | 23.841 | 28.159 |
| DMSO 5% | ekstrak 50% | -14.3333* | .5536 | .000 | -16.492 | -12.174 |
| | ekstrak 25% | -12.5000* | .5536 | .000 | -14.659 | -10.341 |
| | ekstrak 12,5% | -8.3333* | .5536 | .000 | -10.492 | -6.174 |
| | fraksi n-heksana 50% | -15.3333* | .5536 | .000 | -17.492 | -13.174 |
| | fraksi n-heksana 25% | -11.3333* | .5536 | .000 | -13.492 | -9.174 |
| | fraksi n-heksana 12,5% | -9.0000* | .5536 | .000 | -11.159 | -6.841 |
| | fraksi etil asetat 50% | -21.3333* | .5536 | .000 | -23.492 | -19.174 |
| | fraksi etil asetat 25% | -17.6667* | .5536 | .000 | -19.826 | -15.508 |
| | fraksi etil asetat 12,5% | -15.8333* | .5536 | .000 | -17.992 | -13.674 |

| | | | | | |
|------------------|-----------|-------|------|---------|---------|
| fraksi air 50% | -14.0000* | .5536 | .000 | -16.159 | -11.841 |
| fraksi air 25% | -8.8000* | .5536 | .000 | -10.959 | -6.641 |
| fraksi air 12,5% | -7.1667* | .5536 | .000 | -9.326 | -5.008 |
| amoksisilin | -26.0000* | .5536 | .000 | -28.159 | -23.841 |

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

Homogeneous Subsets

Diameter (mm)

| perlakuan | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | | | |
|---------------------------|---|-------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Tukey HSD ^a | 3 | .000 | | | | | | | |
| DMSO 5% | 3 | | 7.167 | | | | | | |
| fraksi air 12,5% | 3 | | 8.333 | | | | | | |
| ekstrak 12,5% | 3 | | 8.800 | | | | | | |
| fraksi air 25% | 3 | | 9.000 | | | | | | |
| fraksi n-heksana 12,5% | 3 | | | 11.333 | | | | | |
| fraksi n-heksana 25% | 3 | | | 12.500 | 12.500 | | | | |
| ekstrak 25% | 3 | | | | 14.000 | 14.000 | | | |
| fraksi air 50% | 3 | | | | 14.333 | 14.333 | | | |
| ekstrak 50% | 3 | | | | | 15.333 | | | |
| fraksi n-heksana 50% | 3 | | | | | 15.833 | 15.833 | | |
| fraksi etil asetat 12,5% | 3 | | | | | | 17.667 | | |
| fraksi etil asetat 25% | 3 | | | | | | | 21.333 | |
| fraksi etil asetat 50% | 3 | | | | | | | | 26.000 |
| amoksisilin | 3 | | | | | | | | |
| Sig. | | 1.000 | .107 | .691 | .107 | .107 | .107 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.