

**POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAN FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL  
ASETAT, DAN AIR DARI DAUN WANGON (*Olex scandens* Roxb)  
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**



Oleh :

**Riana Desi Wulandari  
20144052A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAN FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL  
ASETAT, DAN AIR DARI DAUN WANGON (*Olex scandens* Roxb)  
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

*SKRIPSI*

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai  
derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)*

*Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi*

**Oleh :**

**Riana Desi Wulandari  
20144052A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**PENGESAHAN SKRIPSI**

berjudul


**POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAN FRAKSI *n*-HEXANA, ETIL  
ASETAT, DAN AIR DARI DAUN WANGON (*Olax scandens* Roxb)  
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Oleh :

Riana Desi Wulandari  
20144052A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada tanggal : 3 Juli 2018

Mengetahui,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi

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

Pembimbing,



Reslely Harjanti, M.Sc., Apt

Pembimbing Pendamping,



Dr. Ana Indrayati, M.Si

Penguji :

1. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt

1.....

2. Dra. Nony Puspawati, M.Si

2.....

3. Drs. Mardiyono, M.Si

3.....

4. Reslely Harjanti, M.Sc., Apt.

4.....

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Rasa syukur aku ucapkan kepada-Mu ya Allah atas limpahan karunia-Mu, segala nikmat-Mu yang tak bisa ku hitung dan perlindungan-Mu di dunia. Engkaulah Yang Maha Pemurah lagi Maha Penyayang. Shalawat serta salam selalu aku haturkan Baginda Rasulullah Shalallahu Alaihi Wasallam

Kupersembahkan skripsi ini untuk seseorang yang teristimewa ayahanda dan ibunda tercinta yang dengan tulus dan ikhlas membesarkan, mendidik dan menyayangiku dengan sepenuh hati. Semoga perjuangan orang tua dan saya selama ini dapat berbuah hasil yang manis untuk kedepannya.

Tak pula pula saya ucapkan terimakasih kepada Almamater **Universitas Setia Budi Surakarta tempat penulis menimba ilmu pengetahuan Farmasi**. Rasa syukur aku ucapkan kepada-Mu ya Allah atas limpahan karunia-Mu, segala nikmat-Mu yang tak bisa ku hitung dan perlindungan-Mu di dunia. Engkaulah Yang Maha Pemurah lagi Maha Penyayang. Shalawat serta salam selalu aku haturkan Baginda Rasulullah Shalallahu Alaihi Wasallam

Tak pula pula saya ucapkan terimakasih kepada **ALMAMATER UNIVERSITAS SETIA BUDI SURAKARTA tempat penulis menimba ilmu pengetahuan Farmasi**. Terimakasih juga kepada teman-teman farmasi yang mengambil topik mikrobiologi : lilik, damas, eliz yang saling membantu dalam proses penelitian dan saling memberi semangat dan dukungan sehingga penelitian ini dapat terselesaikan

## PERNYATAAN

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

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

Surakarta, Juli 2018



Riana Desi Wulandari

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum Wr. Wb.*

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi yang berjudul **“POTENSI ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN WANGON (*Olax scandens* Roxb) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.”** ini dengan baik.

Adapun skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta. Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi seluruh masyarakat umum dan bagi ilmu pengetahuan bidang obat tradisional khususnya. Sebelum dan selama masa penelitian maupun selama penyusunan, banyak pihak yang turut membantu dalam penyelesaian skripsi ini. Maka pada kesempatan yang berharga ini penulis menyampaikan terimakasih yang sebesar besarnya kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan kesehatan dan kelancaran dalam pelaksanaan penelitian ini sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan
2. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA. selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
3. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. Selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
4. Reslely Harjanti. M.Sc., Apt selaku pembimbing utama yang telah memberi dukungan, nasehat, masukan, petunjuk dan pengarahan yang maksimal sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan.
5. Dr. Ana Indrayati., M.Si selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan bantuan, bimbingan, dan masukan kepada penulis demi kesempurnaan skripsi ini.
6. Tim penguji yang telah menyediakan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk penyempurnaan skripsi ini.
7. Segenap Dosen, Asisten Dosen, Seluruh Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium, terimakasih atas bantuan dan kerjasamanya

8. Kedua orang tua tercinta atas do'a, kasih sayang, cinta, semangat dan dukungannya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
9. Segenap pihak yang tidak bisa disebutkan satu demi satu yang telah membantu penelitian.

Akhir kata penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna dikarenakan keterbatasan pengetahuan dan kemampuan yang penulis miliki. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun untuk memperbaiki skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pertimbangan ilmu pengetahuan khususnya dibidang farmasi.

*Wabillahittaufik walhidayah wassalamu'alaikum Wr. Wb.*

Surakarta, Juli 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
PERNYATAAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
INTISARI .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	4
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Kegunaan Penelitian .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
A. Tanaman Wangon .....	6
1. Sistematika tanaman .....	6
2. Nama Lain .....	6
3. Morfologi tanaman .....	7
4. Kandungan kimia .....	7
4.1 Flavonoid .....	7
4.2 Saponin .....	8
4.3 Tanin .....	8
4.4 Steroid .....	9
5. Khasiat .....	9
B. Simplisia .....	10
1. Pengertian simplisia .....	10
2. Pengeringan simplisia .....	10
C. Ekstraksi .....	11



1.	Pengertian Ekstrak.....	11
2.	Pengertian Ekstraksi.....	11
3.	Ekstraksi Soxhletasi .....	11
4.	Metode Fraksinasi .....	12
5.	Pelarut.....	13
D.	Sterilisasi .....	14
E.	Bakteri Uji .....	15
1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
F.	Antibakteri.....	16
1.	Definisi .....	16
2.	Mekanisme Kerja Antibakteri.....	17
2.1	Menghambat sintesis dinding sel bakteri. ....	17
2.2	Menghambat fungsi membran sel bakteri. ....	17
2.3	Menghambat sintesis protein bakteri sel bakteri.....	17
2.4	Menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri. ....	17
2.5	Menghambat metabolisme sel bakteri.....	18
G.	Metode Uji Aktivitas Antibakteri .....	18
1.	Metode Difusi .....	18
1.1.	Cara Kirby Bouer. ....	18
1.2.	Cara Tuang ( <i>puor plate</i> ). ....	18
1.3.	Cara Sumuran.....	19
2.	Metode Dilusi.....	19
H.	Ciprofloxacin .....	19
I.	Media.....	20
J.	Landasan Teori.....	21
K.	Hipotesis .....	23
BAB III METODE PENELITIAN .....		24
A.	Populasi dan Sampel .....	24
1.	Populasi .....	24
2.	Sampel .....	24
B.	Variabel Penelitian .....	24
1.	Identifikasi variabel utama .....	24
2.	Klasifikasi variabel utama .....	24
3.	Definisi operasional variabel utama .....	25
C.	Bahan dan Alat.....	26
1.	Bahan .....	26
2.	Alat .....	26
D.	Jalannya Penelitian.....	27
1.	Determinasi tanaman .....	27
2.	Pengumpulan bahan .....	27
3.	Pengeringan dan pembuatan serbuk .....	27
4.	Penetapan susut pengeringan kadar air serbuk daun wangon. ....	27
5.	Pembuatan ekstrak.....	28
6.	Uji bebas etanol ekstrak daun wangon .....	28
7.	Fraksinasi.....	28

8.	Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk, ekstrak dan fraksi.....	29
8.1	Flavonoid.....	29
8.2	Tanin.....	29
8.3	Saponin.....	29
8.4	Terpenoid dan steroid.....	29
8.5	Alkaloid.....	29
8.6	Glikosida.....	29
8.7	Protein.....	30
8.8	Karbohidrat.....	30
9.	Sterilisasi.....	30
10.	Identifikasi Bakteri.....	30
10.1	Identifikasi bakteri secara goresan. Identifikasi bakteri uji.....	30
10.2	Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram.....	30
10.3	Uji Biokimia.....	31
11.	Pembuatan larutan standar kekeruhan Mc Farland.....	32
12.	Pembuatan biakan dan suspensi bakteri.....	32
13.	Pembuatan larutan uji.....	32
14.	Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun wangon ( <i>Olax scandens</i> Roxb).....	33
E.	Teknik pengumpulan data dan analisis data.....	34
F.	Skema Penelitian.....	35
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....		38
A.	Tanaman Wangon ( <i>Olax scandens</i> Roxb.).....	38
1.	Hasil determinasi tanaman wangon.....	38
2.	Pengumpulan dan pengeringan daun wangon.....	38
3.	Pembuatan serbuk daun wangon.....	39
4.	Hasil penetapan kandungan lembab serbuk daun wangon.....	40
5.	Hasil pembuatan ekstrak daun wangon.....	40
6.	Hasil uji bebas etanol daun wangon.....	41
7.	Hasil fraksinasi ekstrak daun wangon.....	43
8.	Hasil identifikasi kandungan senyawa ekstrak dan fraksi-fraksi daun wangon.....	43
9.	Hasil identifikasi bakteri uji <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 257853.....	46
8.1.	Identifikasi bakteri secara goresan. Identifikasi bakteri uji.....	46
8.2.	Uji identifikasi mikroskopis.....	46
8.3.	Uji Biokimia.....	47
10.	Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara difusi.....	48
11.	Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara dilusi.....	52

BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN .....	55
	A. Kesimpulan.....	55
	B. Saran.....	55
	DAFTAR PUSTAKA .....	56
	LAMPIRAN .....	62

## DAFTAR GAMBAR

### Halaman

Gambar 1. Morfologi Daun Wangon (Swamynathan <i>et al</i> 2011) .....	6
Gambar 2. Skema pembuatan Ekstrak dan fraksi daun wangon .....	35
Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun wangon terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 dengan metode difusi .....	36
Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun wangon terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 dengan metode dilusi.....	37

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Rendeman berat daun kering terhadap berat daun basah .....	38
Tabel 2. Rendemen berat serbuk terhadap berat daun kering .....	39
Tabel 3. Hasil penetapan kandungan lembab serbuk daun wangon.....	40
Tabel 4. Rendemen ekstrak daun wangon .....	41
Tabel 5. Uji bebas etanol daun wangon.....	42
Tabel 6. Rendemen hasil fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air dari ekstrak daun wangon .....	43
Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstraks, fraksi <i>n</i> -heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun wangon secara kualitatif .....	44
Tabel 8. Hasil pengujian biokimia bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	47
Tabel 9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dari daun wangon terhadap bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	49
Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun wangon terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	53

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Determinasi tanaman Wangon ( <i>Olex scandens</i> Roxb) .....	63
Lampiran 2. Gambar daun Wangon dan serbuk daun wangon .....	64
Lampiran 3. Gambar Alat –alat .....	65
Lampiran 4. Gambar Alat Soxhletasi dan Corong Pisah .....	66
Lampiran 5. Gambar ekstrak dan hasil Fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air .....	67
Lampiran 6. Gambar hasil identifikasi ekstrak dan fraksi daun wangon .....	68
Lampiran 7. Gambar hasil identifikasi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	70
Lampiran 8. Hasil uji aktivitas antibakteri pelarut DMSO berbagai konsentrasi .....	70
Lampiran 9. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun wangon dengan metode difusi .....	71
Lampiran 10. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun wangon dengan metode dilusi .....	72
Lampiran 11. Perhitungan rendemen simplisia daun wangon .....	75
Lampiran 12. Perhitungan rendemen berat serbuk terhadap berat daun kering ...	75
Lampiran 13. Perhitungan rendemen ekstrak dan fraksi daun wangon .....	75
Lampiran 14. Perhitungan dan pembuatan larutan stok ekstrak etanol dan fraksi daun wangon .....	76
Lampiran 15. Standart kekeruhan Mc Farland .....	78
Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media .....	78

## INTISARI

**WULANDARI, R.D.,2018, POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAN FRAKSI n-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI DAUN WANGON (*Olex scandens Roxb*) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.**

Daun wangon (*Olex scandens Roxb*) merupakan tanaman suku olacaceae. Kandungan kimia daun wangon adalah flavonoid, saponin, tanin dan steroid yang berpotensi sebagai antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun wangon (*Olex scandens Roxb*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Serbuk daun wangon diekstraksi dengan metode soxhletasi menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak yang diperoleh difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Ekstrak dan hasil fraksinasi diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan metode difusi dengan konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% untuk mengetahui fraksi teraktif. Fraksi teraktif selanjutnya diuji aktivitas antibakterinya dengan metode dilusi untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,562%, 0,781%, 0,391%, 0,195%, 0,098%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun wangon (*Olex scandens Roxb*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Fraksi etil asetat konsentrasi 50% merupakan fraksi yang paling aktif dengan diameter hambat rata-rata sebesar  $13,23 \pm 0,25$  mm dan Konsentrasi Bunuh Minimum sebesar 25%.

---

Kata kunci : Daun wangon (*Olex scandens Roxb*), antibakteri, *Pseudomonas aeruginosa*, metode difusi dan dilusi

## ABSTRACT

**WULANDARI, R.D., 2018, POTENCY ANTIBACTERY OF EXTRACT AND FRACTION *n*-HEXANA, ETIL ASETAT, AND WATER FROM WANGON LEAVES (*Olax scandens* Roxb) AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ESSAY, FACULTY OF PHARMACEUTICAL, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA**

Wangon leaf (*Olax scandens* Roxb) is a tribal plants of olacaceae. Chemical content of wangon leaf were flavonoids, saponins, tannins and steroids that were antibacterial. The purpose of this study is to know antibacterial potential of extract, fraction of *n*-hexane, ethyl acetate and water from extract ethanol wangon leaf (*Olax scandens* Roxb) against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Wangon leaf powder was extract with soxhletation method using ethanol 96% solvent. Extract obtained was fractionated with *n*-hexane, ethyl acetate and water solvent. Extract and fractionation results were tested for antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 using diffusion method with concentration 50%, 25% and 12.5% to know the most active fraction. The most active fraction then tested for antibacterial activity with dilution method to determine the minimum inhibitory concentrations and Minimum Bactericidal Concentration with concentrations of 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.562%, 0.781%, 0.391%, 0.195 %, 0.098%.

The ethanol extract, fraction *n*-hexane, ethyl acetate and water of wangon leaf (*Olax scandens* Roxb) had antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Ethyl acetate fraction with concentration 50% was the most active fraction with a mean inhibitory diameter by  $13,23 \pm 0,25$  mm and a Minimum Bactericidal Concentration by 25%.

---

Keywords : Leaf wangon (*Olax scandens* Roxb), antibacterial, *Pseudomonas aeruginosa*, diffusion and dilution



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Penyakit infeksi merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk di negara berkembang, termasuk Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri. Di Indonesia, angka kejadian penyakit infeksi bakteri pada tingkat layanan Rawat Inap Tingkat Lanjut sampai dengan 31 Desember 2016 mencapai 333.227 kasus (Kemenkes RI 2017). Salah satu bakteri yang sering menyebabkan infeksi pada manusia adalah *Pseudomonas aeruginosa*.

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri di antara genus *Pseudomonas* yang paling berbahaya. *Pseudomonas aeruginosa* dapat menyebabkan infeksi pada saluran kemih, sistem pernafasan, kulit, jaringan lunak, bakteriemia dan beragam infeksi sistemik terutama pada pasien dengan luka bakar berat, kanker dan AIDS. Bakteri ini kadang-kadang mengkoloni pada manusia dan menimbulkan infeksi apabila fungsi pertahanan inang abnormal. Bakteri ini disebut patogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi (Yuwono 2012).

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu bakteri patogen penyebab infeksi nosokomial. Angka insiden infeksi nosokomial yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terjadi sekitar 10-15% di dunia dan sekitar 10-20% pada unit perawatan intensif (Biswal *et al* 2014). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Samuel (2013) di ruang Rawat Inap bagian Kebidanan RSUD Abdul Muluk Bandar Lampung pada bulan Oktober-Desember 2011, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menempati urutan pertama penyebab infeksi nosokomial dengan persentase sebesar 25%.

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sering resisten terhadap berbagai jenis antibiotik, sehingga mempersulit pemilihan antimikroba yang sesuai untuk terapi (Jawetz *et al* 2007). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rukomono *et al* (2013), terdapat 14 jenis antibiotik yang diteliti >50% resisten terhadap *Pseudomonas aeruginosa* seperti ampisilin, eritromisin, amoksisilin, sefuroksim,

seftriakson, gentamisin, tetrasiklin, sefadroksil, piperasilin, trimetroprim, tobramisin, kotrimoksazol, nalidiksida, sulfonamid kompleks.

Penggunaan zat antibakteri sintetik merupakan solusi untuk menangani penyakit infeksi bakteri. Ketidaksesuaian dosis yang diberikan pada pengobatan infeksi mengakibatkan terjadinya resistensi bakteri terhadap zat antibakteri tersebut. Faktor lain yang dapat menghambat efektivitas penggunaan zat antibakteri sintetik adalah meningkatnya kejadian resisten bakteri, efek samping yang terkait dengan penggunaan antibakteri sintetik, dan tingginya biaya pengobatan. Dengan demikian, ada kebutuhan konstan dan mendesak untuk mengembangkan zat antibakteri baru yang memiliki potensi untuk pengobatan penyakit infeksi dengan efek samping minimal. Salah satu alternatif yang dapat ditempuh adalah memanfaatkan zat aktif pembunuh bakteri yang terkandung dalam tanaman obat. Banyak tumbuhan yang secara ilmiah terbukti dapat digunakan sebagai obat. Fakta yang menarik bahwa berbagai bagian tanaman obat menunjukkan tingkat aktivitas yang berbeda, berhubungan dengan kandungan fitokimia dan konsentrasinya. Tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat, salah satunya adalah tumbuhan wangon dengan nama latin *Oxalys scandens* Roxb, keluarga *Oxalaceae*.

Tumbuhan wangon merupakan tumbuhan *ethnomedical* berupa tanaman perdu yang banyak dimanfaatkan di India sebagai obat tradisional (Owk dan Lagudu 2016). Di Indonesia Tanaman Wangon biasa tumbuh di hutan Jati. Pada musim kemarau saat pohon jati mengering, tumbuhan wangon mulai tumbuh tunas dan menjadi setitik hijau di antara keringnya jati yang meranggas. Masyarakat desa di sekitar hutan jati sering memanfaatkan tumbuhan wangon sebagai sumber sayuran di musim kemarau karena susah mencari sayuran pada saat itu. Pucuk – pucuk daun wangon yang masih muda dipetik dan dikumpulkan untuk dimasak sayur asem atau dibuat kulupan (Eko 2009). Tumbuhan wangon terdistribusi dari Himalaya barat tropis ke Indo-China, Semenanjung Malaysia dan Indonesia (Jawa, Kepulauan Sunda Kecil) (*Plant Resource of South-East Asia*). Secara tradisional, tanaman wangon digunakan sebagai makanan dan pengobatan. Daun muda pada tumbuhan wangon digunakan sebagai sayuran untuk mengatasi

sembelit dan dikunyah sebagai obat sariawan (Mishra *et al* 2011). Endapan rebusan daun wangon dapat digunakan untuk mengurangi sakit kepala dengan cara dioleskan (Naik *et al* 2015), rebusan kulit batang tanaman wangon digunakan untuk menyembuhkan demam dan batuk (Duraipandiyani *et al* 2006), anemia serta sebagai obat penunjang diabetes (*Indian Medical Plan*).

Penelitian yang telah ada menunjukkan bahwa tumbuhan wangon berpotensi sebagai antioksidan, antipiretik (Naik *et al* 2015), anti mikroba (Duraipandiyani *et al* 2006). Tanaman wangon (*Olax scandens* Roxb.) memiliki nama lain *Olax psittacorum* (Willd.) Vahl (*Plant Resources of South East Asia*). Berdasarkan studi fitokimia pada spesies *Olax psittacorum*, telah dilaporkan mengandung flavonoid, glikosida, asam amino, saponin, tanin, steroid dan terpenoid (Majumder *et al* 2015). Penelitian yang dilakukan Duraipandiyani *et al* (2006), ekstrak *n*-heksana tumbuhan wangon dengan metode perkolasi dingin memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan konsentrasi 2,5 mg/disk pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan daya hambat sebesar 9 mm, namun belum ada informasi mengenai aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun wangon dengan metode soxhletasi.

Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti ingin melakukan penelitian mengenai potensi daun wangon sebagai antibakteri menggunakan metode ekstraksi soxhletasi dengan pelarut etanol 96% sampai tahap fraksinasi. Proses fraksinasi bertujuan untuk memisahkan golongan-golongan senyawa yang terkandung tumbuhan sehingga diperoleh zat murni berdasarkan perbedaan kepolaran senyawa yang terkandung dalam tumbuhan. Pelarut yang digunakan untuk proses fraksinasi adalah *n*-heksana sebagai pelarut non polar, etil asetat sebagai pelarut semi polar, dan air sebagai pelarut polar.

Ekstraksi dengan soxhletasi dipilih karena memberikan keuntungan dibandingkan dengan proses lainnya. Pada ekstraksi soxhletasi, proses ekstraksi akan efektif karena serbuk akan selalu terbasahi oleh cairan penyari yang jernih dan berlangsung kontinyu, tidak membutuhkan banyak pelarut karena sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi dan tidak membutuhkan waktu

yang lama. Proses pemanasan antara pelarut dan bahan organik selama proses ekstraksi dapat memperbaiki kualitas ekstrak yang dihasilkan.

Pemilihan pelarut etanol 96% karena etanol bersifat netral, titik didih relatif lebih rendah, tidak toksik dan lebih mudah menembus membran sel dalam mengekstrak bahan intraseluler dari bahan tanaman (Tiwari *et al* 2011). Menurut Arifianti *et al* (2014) etanol 96% merupakan pelarut pengekstraksi yang terpilih untuk pembuatan ekstrak sebagai bahan baku sediaan *herbal medicine*. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun wangon etanol 96% dengan metode soxhletasi terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginos* ATCC 27853 25923 dengan metode difusi dan dilusi.

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat dirumuskan permasalahannya sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun wangon memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC ?
2. Manakah antara fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun wangon yang memiliki aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ?
3. Berapakah nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dari fraksi teraktif ekstrak etanol daun wangon terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853?

## **C. Tujuan Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah di atas maka penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun wangon terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

2. Mengetahui fraksi yang paling aktif diantara fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun wangon yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853
3. Mengetahui konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dari fraksi teraktif ekstrak etanol daun wangon terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

#### **D. Kegunaan Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang potensi dari daun wangon sebagai alternatif pengobatan antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. Para peneliti dapat memperoleh informasi awal sebagai dasar pertimbangan pembuatan formulasi sediaan ekstrak etanol daun wangon sebagai alternatif pengobatan antibakteri.

## BAB II TINJAUN PUSTAKA

### A. Tanaman Wangon

#### 1. Sistematika tanaman

Klasifikasi tanaman wangon (*Olax scandens* Roxb) adalah :

Kingdom	: Plantae
Sub divisi	: Angiosperms
Kelas	: Eudicotyledon
Bangsa	: Santalales
Keluarga	: Olacaceae
Marga	: Olax
Spesies	: <i>Olax scandens</i> Roxburgh
Sinonim	: <i>Olax psittacorum</i> (Willd)Vahl (Addenda 1989)



**Gambar 1. Morfologi Daun Wangon (Swamynathan *et al* 2011)**

#### 2. Nama Lain

Tumbuhan Wangon (*Olax scandens* Roxb) memiliki nama lain *Olax Psittacorum* (Willd) Vahl. Tumbuhan wangon merupakan tanaman yang terkenal di India dengan nama Badru, di Indonesia terutama di daerah Jawa dikenal dengan nama wangon, di Malaysia dikenal dengan nama meribut dan kodak acing, di Thailand dikenal dengan nama katokrok, di Vietnam dikenal dengan nama đường

dầu leo, di Laos dikenal dengan nama 'i thòk, kh'ôôy sièk (*Plant Resources of South-East Asia*).

### **3. Morfologi tanaman**

Tumbuhan wangon merupakan suatu tanaman monokotil, tinggi pohon sampai 15 meter, tumbuh di India, Burma, Malaysia, vietnam, China dan Indonesia. Tumbuhan wangon termasuk tumbuhan liana (Swamynathan *et al* 2011) yaitu tumbuhan pemanjat dan menopang pada batang tumbuhan lain dengan bergelantungan atau melilit untuk mencapai suatu kanopi dengan ketinggian tertentu dan daunnya berkembang di atas kanopi pohon yang ditumpangnya tersebut. Batangnya berbentuk silinder, halus dan tidak berbulu. Daunnya sederhana, tersusun spiral dan tanpa stipula. Petiole (tangkai daun) panjangnya 6 mm, berkerut, kaku dan berbentuk bulat panjang. Pelepah daun cekung ke atas dan menonjol ke bawah, menunjukkan 4-5 pasang urat sekunder. Susunan bunga majemuk atau biasa dikenal dengan *inflorescence*, perbungaan sederhana tak terbatas dan terdapat pada ketiak daun. Bunganya kecil, berwarna putih, harum dan panjangnya 6 mm. Buahnya tunggal berbentuk bundar, berbiji dengan diameter 8 mm duduk di kelopak bunga, ditandai secara tidak jelas di apeks oleh stigma vesigeal (*Medical Plant Of Asia Pasific*).

### **4. Kandungan kimia**

**4.1 Flavonoid.** Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid merupakan golongan fenolik yang bersifat polar. Senyawa flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai sistem pertahanan dan dalam responsnya terhadap infeksi oleh mikroorganisme, sehingga tidak senyawa ini efektif sebagai antimikroba terhadap sejumlah mikroorganisme. Flavonoid merupakan salah satu senyawa polifenol yang memiliki bermacam-macam efek antara lain efek antioksidan, anti tumor, anti radang, antibakteri dan anti virus (Parubak 2013). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dengan menghambat sintesis asam nukleat dengan cara berinteraksi atau membentuk ikatan hidrogen dengan asam nukleat sehingga

menghambat pembentukan DNA dan RNA. Flavonoid juga berikatan dengan subunit GyrB dari DNA gyrase sehingga dapat mengganggu proses replikasi DNA (Chusnie *et al* 2005). Contoh senyawa flavonoid yang mempunyai aktivitas sebagai antimikroba adalah chrysin, quersetin, rutin (Tiwari *et al* 2011).

**4.2 Saponin.** Saponin adalah glikosida yang banyak terdapat dalam tanaman, diricikan dengan rasa pahit, berbusa, dan bersifat hemolisis pada sel darah merah (Zuhud *et al* 2001). Saponin memiliki glikosil sebagai gugus polar serta gugus steroid atau triterpenoid sebagai gugus nonpolar sehingga bersifat aktif permukaan dan membentuk misel saat dikocok dengan air. Pada struktur misel gugus polar menghadap ke luar sedangkan gugus nonpolar menghadap ke dalam dan keadaan inilah yang tampak seperti busa (Sangi *et al* 2008). Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu permeabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteri menjadi lisis, selain itu saponin juga memiliki sifat lipofilik yang dapat masuk ke lapisan lipid membran sel kemudian mengikat lipid pada membran sel, membentuk senyawa kompleks lipid-saponin sehingga menghancurkan sifat permeabilitas membran sel, menyebabkan pelepasan isi sel dan menimbulkan kematian sel (Permatasari 2013). Contoh senyawa saponin yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba adalah vinalginsenosides-R5 dan vinalginsenosides-R6 (Tiwari *et al* 2011).

**4.3 Tanin.** Tanin merupakan salah satu metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman, rasanya pahit, kelat dan disintesis oleh tanaman untuk melindungi tumbuhan dari hama maupun mikroorganisme lainnya. Tanin tergolong senyawa polifenol yang karakteristiknya dapat membentuk senyawa kompleks. Tanin larut dalam pelarut organik polar namun tidak larut dalam pelarut organik non polar (Jayanegara *et al* 2008). Mekanisme kerja tanin dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein dinding sel bakteri sehingga dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel bakteri (Azima 2004). Selain itu tanin memiliki kemampuan menghambat enzim DNA topoisomerase sehingga proses replikasi DNA menjadi terganggu (Nuria *et al* 2009). Contoh senyawa



tanin yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba adalah Ellagitannin (Tiwari *et al* 2011).

**4.4 Steroid.** Steroid adalah senyawa non polar yang termasuk dalam golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh siklopentanodihidroperhidrofenantrena yang memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung dalam ujung cincin sikloheksana tersebut (Poedjiadi 1994). Mekanisme steroid sebagai antibakteri merusak dengan membran lipid pada sel bakteri (Akiyama *et al* 2001). Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis (Ahmed 2007).

## 5. Khasiat

Secara tradisional, tumbuhan wangon (*Olax scandens* Roxb) digunakan sebagai makanan dan pengobatan. Daun muda pada tumbuhan wangon digunakan sebagai sayuran untuk mengatasi sembelit dan dikunyah sebagai obat sariawan (Mishra *et al* 2011). Endapan rebusan daun wangon dapat digunakan untuk mengurangi sakit kepala dengan cara dioleskan (Naik *et al* 2015), rebusan kulit batang tumbuhan wangon digunakan untuk menyembuhkan demam, batuk (Duraipandiyan *et al* 2006), gangguan ginjal (Swamynathan *et al* 2011) dan anemia serta sebagai obat penunjang diabetes (*Indian Medical Plant*). Penelitian yang telah ada menunjukkan bahwa daun tumbuhan wangon berpotensi sebagai antioksidan (Naik *et al* 2015) dan antimikroba (Duraipandiyan *et al* 2006), bagian batang tumbuhan wangon berpotensi sebagai antipiretik (Naik *et al* 2015) dan akarnya juga berpotensi sebagai antimikroba (Owk dan lagudu 2016).

## **B. Simplisia**

### **1. Pengertian simplisia**

Menurut Farmakope herbal indonesia (2008), simplisia adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan. Kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan simplisia tidak lebih dari 60°C.

### **2. Pengeringan simplisia**

Pengeringan merupakan proses pengawetan simplisia sehingga simplisia tahan lama dalam penyimpanan. Pengeringan akan menghindari teruainya kandungan kimia karena pengaruh enzim. Pengeringan yang cukup akan mencegah pertumbuhan mikroorganisme dan kapang (jamur). Pengeringan sebaiknya jangan di bawah sinar matahari langsung, melainkan dengan almari pengering yang dilengkapi dengan kipas penyedot udara sehingga terjadi sirkulasi yang baik. Bila terpaksa dilakukan pengeringan di bawah sinar matahari maka perlu ditutup dengan kain hitam untuk menghindari terurainya kandungan kimia dan debu. Bahan simplisia harus dibuat rata dan tidak bertumpuk agar proses pengeringan berlangsung lebih singkat. Cara pengeringan diupayakan sedemikian rupa agar tidak merusak kandungan aktifnya. Tandanya simplisia sudah kering adalah mudah meremah bila diremas atau mudah patah (DepKes RI 1985). Pengeringan ditempat yang teduh biasanya digunakan untuk bahan baku yang kandungan utamanya minyak atsiri atau senyawa lain yang sifatnya termolabil (DepKes RI 2008). Pengeringan dengan menggunakan oven akan memberikan produk yang lebih baik dianggap lebih menguntungkan karena akan terjadi pengurangan kadar air dalam jumlah besar dalam waktu yang singkat (Winangsih 2013). Pengeringan bahan simplisia dapat dilakukan pada suhu 30-90°C, namun suhu yang terbaik adalah tidak lebih dari 60°C. Proses pengeringan dapat dipengaruhi oleh hal-hal berikut yaitu suhu pengeringan, waktu pengeringan, kelembapan, ketebalan bahan baku yang dikeringkan, sirkulasi udara dan luas permukaan bahan.

## C. Ekstraksi

### 1. Pengertian ekstrak

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

### 2. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan zat dari campurannya atau penarikan kandungan kimia terlarut yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair (DepKes RI 2000). Selama proses ekstraksi, cairan penyari akan berdifusi sampai ke material padat dari tumbuhan dan akan melarutkan senyawa dengan polaritas yang sesuai dengan cairan penyari. Cairan penyari yang dapat digunakan antar lain air, eter, campuran etanol dan air. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor yaitu sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi untuk memperoleh ekstrak yang sempurna. Sifat dari bahan mentah obat mentah adalah hal yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan suatu metode ekstraksi (Tiwari *et al* 2011).

### 3. Ekstraksi Soxhletasi

Soxhletasi adalah ekstraksi yang dilakukan dengan cara panas menggunakan pelarut yang selalu baru, dengan menggunakan alat soxhlet sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan karena adanya pendingin balik (DepKes RI 2000). Prinsip ekstraksi soxhletasi adalah pemanasan dan perendaman sampel.

Pemanasan dan perendaman sampel menyebabkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Dengan demikian, metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut ke dalam pelarut organik. Larutan itu kemudian menguap ke atas dan melewati pendingin udara yang akan mengembunkan uap tersebut menjadi tetesan yang akan terkumpul kembali. Bila larutan melewati batas lubang pipa samping

soxhlet maka akan terjadi sirkulasi. Sirkulasi yang berulang itulah yang menghasilkan ekstrak yang baik (DepKes RI 1985).

Cara menghentikan soxhletasi adalah dengan menghentikan pemanasan yang sedang berlangsung. Ekstraksi dikatakan sudah selesai jika pelarut yang digunakan untuk ekstraksi sudah tidak berwarna lagi. Syarat pelarut yang digunakan dalam proses soxhletasi yaitu mudah menguap, titik didih rendah, dapat melarutkan senyawa yang diinginkan, dapat terpisah dengan cepat setelah pengocokan, sifatnya sesuai dengan senyawa yang akan diisolasi (Polar atau non polar) (DepKes RI 1985).

Kelebihan metode ekstraksi bahan alam dengan alat soxhletasi yaitu pelarut organik dapat menarik senyawa organik dalam bahan alam secara berulang kali, waktu yang digunakan lebih efisien, proses ekstraksi berjalan terus-menerus sesuai dengan keperluan tanpa menambah volume pelarut. Hal ini sangat menguntungkan karena selain ekonomis, akan diperoleh ekstrak yang lebih pekat. Dengan kata lain, pelarut yang dibutuhkan lebih sedikit dibandingkan dengan metode maserasi atau perkolasi (Pavia 1995).

Kekurangan metode ekstraksi soxhletasi yaitu larutan dipanaskan terus-menerus sehingga kurang sesuai untuk zat aktif yang tidak tahan panas. Hal ini dapat diperbaiki dengan menambah peralatan yang dapat mengurangi tekanan udara. Selain itu, cairan penyari dididihkan terus-menerus, sehingga cairan penyari harus murni (DepKes RI 1985).

#### **4. Metode Fraksinasi**

Ekstrak awal merupakan campuran dari berbagai senyawa. Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama. Fraksinasi merupakan suatu proses penarikan senyawa tertentu dari campuran kompleks yang terdapat di dalam suatu ekstrak dengan menggunakan beberapa pelarut yang tidak saling campur untuk menyederhanakan keanekaragaman senyawa. Pelarut yang umum digunakan untuk proses fraksinasi adalah *n*-heksana, etil asetat dan air karena berbagai

pelarut ini memiliki tingkat kepolaran yang berbeda-beda (Sarker *et al* 2006). Hal ini sejalan dengan tujuan fraksinasi yaitu untuk memisahkan golongan utama suatu senyawa yang satu dengan golongan utama senyawa lainnya berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan senyawa yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa yang bersifat polar akan terlarut dalam pelarut polar begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan terlarut dalam pelarut non polar (Sarker *et al* 2006)

## 5. Pelarut

Pelarut adalah cairan yang digunakan untuk melarutkan zat lain. Pemilihan pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi sangat berpengaruh terhadap penentuan senyawa aktif dari tanaman obat. Sifat pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah toksisitas dari pelarut yang rendah, mudah menguap pada suhu rendah, dapat mengekstraksi komponen senyawa dengan cepat, dapat mengawetkan dan tidak menyebabkan ekstrak terdisosiasi. Pemilihan pelarut juga tergantung dari senyawa yang ditargetkan. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pelarut yang dipilih adalah pelarut yang dapat melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung dalam tumbuhan. Faktor utama untuk pertimbangan pada pemilihan pelarut adalah selektivitas, ekonomis, keamanan dan ramah lingkungan (DepKes RI 2000). Pelarut yang bersifat polar akan melarutkan senyawa yang bersifat polar seperti glikosida flavonoid, glikosida saponin dan tanin. Pelarut yang bersifat semi polar akan melarutkan senyawa yang bersifat semi polar seperti alkaloid, senyawa fenolik, flavonoid. Pelarut non polar akan melarutkan senyawa yang bersifat non polar seperti lemak steroid, triterpenoid, sterol dan fenil propanoid (Tiwari *et al* 2011). Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah :

**5.1. Etanol.** Etanol dipilih sebagai pelarut karena etanol lebih selektif, dengan konsentrasi di atas 20% kuman sulit tumbuh dalam etanol, bersifat netral dan tidak toksik, absorpsinya baik, dapat bercampur dengan air pada berbagai perbandingan. Etanol lebih mudah menembus membran sel dalam mengekstrak bahan intraseluler dari bahan tanamann (Tiwari *et al* 2011). Etanol 96% memiliki

titik didih sebesar 78,5%. Etanol merupakan pelarut ideal yang sering digunakan dan merupakan pelarut yang mengekstraksi senyawa yang memiliki berat molekul rendah seperti alkaloid, saponin, dan flavonoid (Arifianti *et al* 2014).

**5.2 n-Heksan.** *n*-Heksan merupakan pelarut non polar berupa cairan yang jernih, mudah menguap, berbau seperti eter atau bau seperti petroleum, praktis tidak larut dalam air namun dalam etanol dan dapat bercampur dengan eter, chloroform, benzena, sebagian besar minyak serta minyak atsiri (Depkes 1986). *n*-heksan adalah hasil dari penyulingan minyak yang telah bersih terdiri atas campuran rangkaian hidrokarbon, bersifat mudah terbakar. Pelarut *n*-heksana dapat melarutkan senyawa terpenid, sisterpenoid, sterol dan fenil propanoid (Tiwari *et al* 2011).

**5.3 Etil asetat.** Etil asetat merupakan pelarut semi polar, mudah menguap, cairan jernih tidak berwarna, bau khas, larut dalam 15 bagian air, bercampur dengan eter, kloroform dan etanol. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut etil asetat adalah flavonoid, alkaloid, dan senyawa-senyawa fenolik, asam fenolat, fenil propanoid, antraknon dan xanton (Harborne 2007)

**5.4 Air.** Air dipertimbangkan sebagai pelarut yang stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah. Kemampuan air dalam melarutkan zat tersimpan dalam polaritas yang dimiliki air. Air dapat melarutkan zat-zat yang bersifat ionik dan zat polar saja. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut air adalah garam alkaloid, minyak menguap, gula, gom, pati, protein, enzim, lendir, lilin, lemak, peptida, zat warna dan asam organik (List dan Schamidt 2000)

#### **D. Sterilisasi**

Sterilisasi merupakan suatu tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah dan kering, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar-X, sinar  $\alpha$ , sinar gamma dan sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu dengan penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu dengan menggunakan saringan atau filter untuk bahan yang

akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemansan tinggi atau tekanan tinggi. Bahan atau pelarut yang digunakan dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu atau merusak media ataupun mengganggu kehidupan dalam proses yang sedang dikerjakan (Suriawiria 2005).

Media yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan cara dimasukkan ke dalam autoclav pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan cara dimasukkan ke dalam oven pada suhu 170°C-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan menggunakan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin (Denyer *et al* 2004).

## **E. Bakteri Uji**

### **1. *Pseudomonas aeruginosa***

Klasifikasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Divisio	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Orde	: Pseudomonadales
Family	: Pseudomonadaceae
Genus	: Pseudomonas
Species	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

*Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri diantara genus *Pseudomonas* yang paling patogen dan merupakan flora normal usus dan kulit dalam jumlah kecil pada manusia. *Pseudomonas aeruginosa* tersebar luas di alam dan biasanya ditemukan pada lingkungan rumah sakit yang lembab. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang dan motil, berukuran sekitar 0,6 x 2 µm serta tampak dalam bentuk tunggal berpasangan dan kadang-kadang rantai pendek. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri obligat aerob yang menghasilkan aroma manis atau berbau seperti anggur

yang membentuk koloni yang bundar dan licin dengan warna kehijauan yang berfluoresensi pada medium kultur (Jawetz *et al* 2007).

*Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni yang bersifat saprofit pada manusia sehat, tetapi menyebabkan penyakit pada manusia dengan pertahanan tubuh yang tidak adekuat. *Pseudomonas aeruginosa* menjadi patogenik jika mencapai daerah yang tidak memiliki pertahanan normal, misalnya pada membran mukosa dan kulit yang terluka oleh cedera jaringan langsung. Bakteri tersebut melekat dan membentuk koloni pada membran mukosa atau kulit, menginvasi secara lokal dan menyebabkan penyakit sistemik. Proses terjadinya infeksi oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dibantu oleh enzim ekstraseluler meliputi elastase, protease dan dua hemolisin fosfolipase. Lipopolisakarida pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berperan langsung dalam menyebabkan demam, syok, oliguria (pengeluaran urin berkurang), leukositosis (jumlah sel darah putih terlalu banyak) dan leukopenia (jumlah sel darah putih yang ada di dalam tubuh rendah), koagulasi intravaskular diseminata (suatu sindrom yang ditandai dengan adanya perdarahan akibat trombin bersirkulasi dalam darah) dan sindrom gawat napas pada dewasa (Jawetz *et al* 2007).

Tanda dan gejala yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* kebanyakan tidak spesifik dan berkaitan dengan organ yang terkena. Jika bakteri masuk melalui pungsi lumbal dapat menyebabkan meningitis dan jika masuk melalui kateter menyebabkan infeksi saluran kemih. Jika bakteri mencapai saluran pernapasan melalui alat bantu nafas yang terkontaminasi, menyebabkan pneumonia nekrotikans. *Pseudomonas aeruginosa* dapat menginvasi aliran darah dan menyebabkan sepsis yang fatal pada pasien luka bakar (Jawetz *et al* 2007).

## **F. Antibakteri**

### **1. Definisi**

Antibakteri adalah suatu obat atau senyawa yang digunakan untuk membasmi bakteri, khususnya bakteri yang bersifat merugikan manusia. Zat antibakteri dapat bersifat bakterisidal (kemampuan untuk membunuh bakteri),



bakteriostatik (kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri), dan germisida (menghambat germisida spora bakteri) (Jawetz *et al* 2007).

## 2. Mekanisme kerja antibakteri

Mekanisme kerja antibakteri dibagi menjadi lima kelompok yaitu :

**2.1 Menghambat sintesis dinding sel bakteri.** Dinding sel bakteri terdiri dari polipeptida yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glukopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukan atau merusak dinding sel. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis. Contoh antibiotik yang bekerja dengan cara menghambat sintesis dinding sel bakteri adalah penisilin, sefalosporin, vankomisin dan sikloserin (Jawetz *et al* 2007).

**2.2 Menghambat fungsi membran sel bakteri.** Membran sel berguna sebagai penghalang yang selektif dan menjalankan fungsi transport aktif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen dari dalam sel bakteri yaitu makromolekul dan ion sehingga terjadi kematian bakteri. Contoh antibiotik yang bekerja dengan cara menghambat fungsi membran sel bakteri adalah antibiotik polimiksin, asam nalidiksat, daptomisin, valinomisin, amfoterisin dan imidazol (Jawetz *et al* 2007).

**2.3 Menghambat sintesis protein bakteri sel bakteri.** Bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Penghambatan sintesis protein bakteri menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein, akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan non fungsional bagi sel bakteri. Contoh antibakteri yang bekerja dengan cara menghambat sintesis protein bakteri sel bakteri adalah eritromisin, linkomisin, tetrasiklin dan kloramfenikol (Jawetz *et al* 2007).

**2.4 Menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri.** Mekanisme dalam menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri, salah satu adalah menghalangi sintesis DNA dengan cara memblokir DNA gyrase contohnya antibiotik kuinolon dan fluorokuinolon. Antibiotik rifampisin bekerja dengan membentuk ikatan

dengan enzim polimerase RNA sehingga menghambat sintesis RNA oleh enzim tersebut (Jawetz *et al* 2007).

**2.5 Menghambat metabolisme sel bakteri.** Bakteri membutuhkan asam folat untuk hidup, sehingga harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoas (PABA) untuk memenuhi kebutuhan hidupnya. Senyawa antibakteri bersaing dengan PABA untuk diikuti sertakan dalam pembentukan asam folat menyebabkan terbentuknya analog asam folat non fungsional sehingga kebutuhan asam folat sel bakteri tidak terpenuhi. Kebutuhan asam folat oleh sel bakteri yang tidak terpenuhi menyebabkan kematian sel bakteri. Contoh antibakteri yang bekerja dengan menghambat metabolisme sel bakteri adalah sulfonamida dan trimetoprim (Jawetz *et al* 2007).

### **G. Metode Uji Aktivitas Antibakteri**

Pengujian aktivitas antimikroba dapat dilakukan dengan dua cara yaitu metode difusi dan dilusi.

#### **1. Metode Difusi**

Prinsip metode difusi adalah potensi antimikroba berdasarkan luasnya daerah hambat pertumbuhan bakteri akibat berdifusinya senyawa uji dari titik awal pemberian ke daerah difusi. Mikroba diinokulasikan pada media yang sesuai dan di atasnya diletakan kertas cakram yang mengandung senyawa uji atau dibuat sumuran dengan diameter tertentu yang di isi dengan senyawa uji. Metode difusi menurut pramita (2013) dapat dibagi menjadi beberapa cara yaitu :

**1.1. Cara kirby bouer.** Cara ini dilakukan dengan cara menginokulasikan suspensi bakteri dengan konsentrasi tertentu pada permukaan media agar sampai rata. Kertas disk yang mengandung senyawa uji diletakan di atas media agar kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Potensi antimikroba dilihat dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk.

**1.2. Cara tuang (*puor plate*).** Cara tuang dilakukan dengan cara mencampur 1 ml suspensi bakteri dengan 4 ml agar base 1,5% pada temperatur 50°C hingga homogen kemudian dituang ke dalam media Mueller Hinton Agar (MHA) dan dibiarkan sampai mengeras. Disk yang mengandung zat uji diletakan

di atasnya kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca seperti pada cara kirby bouer.

**1.3. Cara sumuran.** Penyiapan media dilakukan seperti pada cara kirby bouer. Media agar yang telah di inokulasi suspensi bakteri dibuat sumuran dengan diameter tertentu dan tegak lurus terhadap permukaan media. Senyawa uji kemudian di masukan ke dalam sumuran dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca seperti pada cara kirby bouer.

## **2. Metode Dilusi**

Metode dilusi digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari bahan uji. Prinsip metode dilusi adalah senyawa uji dicerkan hingga diperoleh berbagai macam konsentrasi. Pada dilusi cair, masing-masing senyawa uji ditambahkan suspensi bakteri dalam media cair kemudian di inkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. Pada tabung yang mengandung senyawa uji dan suspensi bakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai KHM. Senyawa yang ditetapkan sebagai KHM, diuji kembali pada media padat tanpa penambahan bakteri uji dan media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Konsentrasi terkecil dalam media yang tidak menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM.

## **H. Ciprofloxacin**

Ciprofloxacin adalah antibiotik golongan kuinolon generasi kedua yang digunakan untuk pengobatan infeksi bakteri gram negatif seperti *E.coli*, *P.mirabilis*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa* dan bakteri gram positif tertentu seperti *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus sp* (Siswandono 2008). Ciprofloxacin merupakan obat yang aktif untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* (Jawetz *et al* 2007). Mekanisme kerja antibiotik ciprofloxacin dengan cara menghambat sintesis asam nuklet dimana antibiotik golongan flurokuinolon dapat masuk ke dalam sel dengan cara difusi pasif melalui kanal protein terisi air (porins) pada membran luar bakteri secara intraseluler. Selain itu, secara unik antibiotik

golongan flurokuinolon dapat menghambat replikasi DNA *gyrase* (topoisomerase II) selama pertumbuhan dan replikasi bakteri (Mycek 2011).

### **I. Media**

Media merupakan suatu bahan yang terdiri atas campuran zat makanan (nutrient) yang berfungsi sebagai tempat tumbuh mikrobia. Selain untuk menumbuhkan mikrobia, medium dapat digunakan juga untuk isolasi, memperbanyak, pengujian sifat-sifat fisiologi, dan perhitungan jumlah mikrobia. Syarat-syarat suatu medium harus memenuhi hal-hal sebagai berikut: mengandung nutrisi yang diperlukan mikrobia, memiliki tekanan osmosis, pH, tegangan permukaan yang sesuai, tidak mengandung zat penghambat (inhibitor), dan steril.

Syarat media yang baik untuk pertumbuhan mikroba adalah lingkungan kehidupannya harus sesuai dengan lingkungan pertumbuhan mikroba tersebut, yaitu : susunan makanannya (media harus mengandung air untuk menjaga kelembaban dan untuk pertukaran zat/metabolisme, juga mengandung sumber karbon, mineral, vitamin dan gas), tekanan osmose yaitu harus isotonik, derajat keasaman/pH umumnya netral tapi ada juga yang alkali, temperatur harus sesuai dan steril. Media harus mengandung semua kebutuhan untuk pertumbuhan mikroba, yaitu: sumber energi (contoh: gula), sumber nitrogen, juga ion inorganik essensial dan kebutuhan yang khusus, seperti vitamin.

Berdasarkan komposisi kimianya, media dapat dibedakan menjadi media sintetik yaitu media yang susunan kimianya diketahui dengan pasti, medium ini biasanya digunakan untuk mempelajari kebutuhan makanan mikroba. Media non sintetik (kompleks) yaitu media yang susunan kimianya tidak dapat diketahui dengan pasti, media ini digunakan untuk menumbuhkan dan mempelajari taksonomi mikroba. Berdasarkan konsistensinya media dapat dibedakan menjadi media cair, media padat, dan media padat yang dapat dicairkan (Panduan Praktikum Mikrobiologi Universitas Sanata Dharma 2016).

## J. Landasan Teori

Secara tradisional, tumbuhan wangon digunakan sebagai obat di India. Daun muda pada tumbuhan wangon digunakan sebagai sayuran untuk mengatasi sembelit dan dikunyah sebagai obat sariawan (Mishra *et al* 2011). Endapan rebusan daun wangon dapat digunakan untuk mengurangi sakit kepala dengan cara dioleskan (Naik *et al* 2015), rebusan kulit batang tanaman wangon digunakan untuk menyembuhkan demam dan batuk (Duraipandiyan *et al* 2006) dan anemia serta sebagai obat penunjang diabetes (*Indian Medical Plan*).

Tanaman wangon (*Olox scandens* Roxb.) memiliki nama lain *Olox psittacorum* (Willd.) Vahl (*Plant Resources of South East Asia*). Berdasarkan studi fitokimia pada spesies *Olox psittacorum*, daun tanaman wangon mengandung flavonoid, glikosida, asam amino, saponin, tanin, steroid dan terpenoid (Majumder *et al* 2015). Flavonoid, saponin, tanin, steroid dan terpenoid merupakan metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Flavonoid sebagai antibakteri bekerja dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri kemudian di ikuti dengan pengeluaran senyawa dari dalam sel bakteri (Ngajow *et al* 2013). Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan menghambat fungsi membran sel mikroba. Saponin membentuk senyawa kompleks dengan membran sel melalui ikatan hidrogen sehingga menghancurkan sifat permeabilitas dinding sel, menyebabkan pelepasan isi sel dan menimbulkan kematian sel (Permatasari 2013). Tanin bekerja sebagai antibakteri dengan membentuk kompleks polisakarida yang dapat merusak dinding sel bakteri (Nurhalimah *et al* 2014). Steroid bekerja sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom (Akiyama *et al* 2001). Terpenoid dapat bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat dan merusak porin, mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi, pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Rachmawati 2011).

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri diantara genus Pseudomonds yang paling sering menyebabkan infeksi pada manusia. *Pseudomonas aeruginosa* dapat menyebabkan infeksi pada saluran kemih, sistem pernafasan, kulit, jaringan lunak, bakteriemia dan beragam infeksi sistemik terutama pada pasien dengan luka bakar berat, kanker dan AIDS/immunosuppressed. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri patogen penyebab infeksi nosokomial (Prabhu *et al* 2006).

Peningkatan prevalensi resistensi multidrug resisten terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sehingga diperlukan pengembangan antibiotik baru yang memiliki potensi tinggi untuk pengobatan penyakit infeksi. Salah satu alternatif yang dapat ditempuh adalah memanfaatkan zat aktif pembunuh bakteri yang terkandung dalam tanaman obat (Widjayanti 1999). Tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat adalah tumbuhan Wangon (*Olax scandens* Roxb). Veeramuthu Duraipandiyar *et al* (2006) telah melaporkan bahwa ekstrak *n*-heksan *Olax scandens* Roxb menggunakan metode perkolasi dingin pada konsentrasi 2,5 mg/disk mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan daya hambat sebesar 9 mm. Penelitian yang dilakukan oleh Raja Majumder *et al* (2015), ekstrak metanol spesies *Olax psittacorum* (Willd.) Vahl dengan metode maserasi pada konsentrasi 250mg/ml disk mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan daya hambat sebesar 6,33mm.

Pengujian aktivitas bakteri ini menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi bertujuan untuk melihat potensi antimikroba berdasarkan luasnya zona hambat pertumbuhan bakteri akibat berdifusinya senyawa uji dari titik pemberian ke daerah difusi. Metode dilusi bertujuan mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Prinsip metode dilusi adalah senyawa uji diencerkan hingga diperoleh berbagai macam konsentrasi. Tabung yang mengandung senyawa uji dan suspensi bakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai KHM. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 18-24 jam. Hasil dari

Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media *Muller Hinton Agar* (MHA) yang tidak menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri.

### **K. Hipotesis**

Berdasarkan permasalahan yang ada, maka hipotesis dalam penelitian ini adalah:

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun wangon (*Olax scandens* Roxb) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Kedua, Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun wangon (*Olax scandens* Roxb) mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Ketiga, konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi teraktif daun wangon (*Olax scandens* Roxb) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat ditentukan dari hasil penelitian.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun wangon (*Olax scandens Roxb*) yang diambil dari Dusun Pare, Desa Baleharjo, Kecamatan Sukodono, kabupaten Sragen, Jawa Tengah.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun wangon yang diambil secara acak. Daun diambil dalam kondisi yang masih segar, tidak busuk, belum berubah warna dan bersih dari kotoran yang diperoleh dari Dusun Pare, desa Baleharjo, Kecamatan Sukodono, kabupaten Sragen, Jawa Tengah pada bulan Januari 2017.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama adalah ekstrak etanol dari daun wangon (*Olax scandens Roxb*)

Variabel utama kedua adalah fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun wangon

Variabel utama ketiga adalah aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun wangon terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 dengan metode difusi.

Variabel utama keempat adalah fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri paling aktif berdasarkan diameter zona hambat yang paling besar.

Variabel utama kelima adalah aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun wangon terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 dengan metode dilusi.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

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



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

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian, Variabel tergantung pada penelitian adalah pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada media yang dipengaruhi oleh ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun wangon.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel tergantung seperti uji kemurnian *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, kondisi laboratorium meliputi kondisi inkas, alat bahan yang digunakan harus steril serta media yang digunakan dalam penelitian.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun wangon adalah daun dari tanaman wangon yang diperoleh dari daerah persawahan di Dusun Pare, desa Baleharjo, Kecamatan Sukodono, kabupaten Sragen, Jawa Tengah dengan kondisi segar dan belum layu.

Kedua, serbuk daun wangon adalah daun wangon yang diambil kemudian dicuci guna membersihkan kotoran yang masih menempel setelah itu dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 50°C sampai kering, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 60.

Ketiga, ekstrak etanol daun wangon adalah hasil ekstraksi serbuk daun wangon dengan cara soxhletasi menggunakan pelarut etanol 96% yang kemudian dipekatkan dengan *vaccum rotary evaporator*.

Keempat, fraksi *n*-heksana daun wangon adalah hasil fraksinasi dari ekstrak etanol daun wangon menggunakan pelarut *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat daun wangon adalah hasil fraksinasi dari residu *n*-heksana menggunakan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air daun wangon adalah hasil fraksinasi dari residu etil asetat.

Ketujuh, bakteri uji pada penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, Metode difusi adalah dengan membuat lubang pada media yang sudah padat kemudian diisi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun wangon dengan konsentrasi 12,5, 25%, 50%, kontrol positif (Siprofloksasin) dan kontrol negatif (DMSO 5%).

Kesembilan, Metode dilusi adalah metode uji aktivitas antibakteri dengan membuat satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,562%, 0,781%, 0,391%, 0,195%, 0,098% Kontrol positif adalah suspensi bakteri dalam media Brain Heart Infusion (BHI) dan kontrol negatif adalah ekstrak etanol daun wangon fraksi teraktif.

## **C. Bahan dan Alat**

### **1. Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun wangon, etanol 96%, *n*-heksana, etil asetat, larutan DMSO 1%, media BHI, media PSA, media MHA, standar Mc Farland, media SIM, media KIA, media LIA, media sitrat, larutan Gram A, larutan Gram B, larutan Gram C, larutan Gram D, aquades, asam sulfat pekat, kloroform, reagen Mayer, reagen Dagrendoff, asam klorida, natrium hidroksida, asam asetat, FeCl<sub>3</sub>, timbal asetat 10%, cat kristal violet, larutan lugol iodine, cat safranin dan siprofloksasin.

### **2. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : timbangan analitik, oven, alat penggiling, pengayak nomor 60, alat soxhletasi, alat *Vacum Rotary Evaporator*, *beakerglass*, corong pisah, tabung reaksi, corong kaca, kain flannel, kertas saring, gelas ukur, autoklaf, mikroskop, objek glass, deck glass, inkubator, lampu spiritus, pipet tetes, pipet volume, micropipet, ose platina, cawan petri, pinset, spuit 1cc.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman**

Tahap pertama penelitian adalah melakukan determinasi tanaman wangon (*Olax scandens* Roxb) yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi daun wangon terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

### **2. Pengumpulan bahan**

Daun wangon diperoleh dari daerah persawahan di Dusun Pare, desa Baleharjo, Kecamatan Sukodono, kabupaten Sragen, Jawa Tengah. Daun wangon dibersihkan dari cecairan atau kotoran, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C sampai kering. Pembuatan serbuk dengan diblender dan diayak menggunakan ayakan nomer 60 kemudian diperoleh serbuk daun wangon yang diinginkan.

### **3. Pengeringan dan pembuatan serbuk**

Bahan baku berupa daun wangon segar dibersihkan dan dicuci terlebih dahulu dengan air bersih, lalu bahan diletakkan pada loyang yang terbuat dari aluminium dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 50°C sampai kering. Daun wangon yang telah kering kemudian dibuat serbuk dengan cara diblender kemudian diayak dengan ayakan nomer 60 sehingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan yang sama. Pembuatan serbuk ini bertujuan untuk memperluas permukaan partikel bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyerapan dapat berlangsung efektif. Pembuatan serbuk simplisia merupakan proses awal pembuatan ekstrak. Serbuk simplisia dibuat dari simplisia utuh yang sudah dikeringkan dengan suatu alat tanpa menyebabkan kerusakan atau kehilangan kandungan kimia yang dibutuhkan dan diayak hingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan yang diinginkan.

### **4. Penetapan kandungan lembab serbuk daun wangon**

Penetapan kandungan lembab dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* dengan ditimbang sebanyak 2 gram serbuk daun wangon pada suhu 105°C serta waktu pengeringan secara otomatis. Kemudian ditunggu

sampai alat *moisture balance* berbunyi yang menandakan hasil analisis telah selesai. Kadar lembab serbuk daun wangon akan memenuhi syarat apabila kadar air suatu serbuk tidak lebih dari 10% (DepKes RI 2008).

## **5. Pembuatan ekstrak**

Serbuk daun wangon ditimbang sebanyak 50,0 gram dibungkus kertas saring kemudian dimasukkan alat soxhletasi, dengan penambahan etanol 96% hingga terjadi satu setengah kali sirkulasi. Proses ekstraksi dilakukan sampai sampel terekstraksi semua, ditandai dengan cairan penyaringnya jernih. Ekstrak yang didapat dipekatkan dengan alat *vaccum evaporator* sampai kental dan bebas etanol.

## **6. Uji bebas etanol ekstrak daun wangon**

Uji bebas etanol ekstrak daun wangon dilakukan dan dibuktikan di Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Uji bebas etanol ekstrak daun wangon dilakukan dengan uji esterifikasi etanol menggunakan larutan  $H_2SO_4$  pekat dan  $CH_3COOH$  kemudian dipanaskan, hasil uji bebas etanol dalam ekstrak daun wangon ditandai dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol (Rissa *et al* 2017). Ekstrak diuji etanolnya untuk mengetahui apakah ekstrak daun wangon benar-benar bebas dari etanol, karena jika masih mengandung etanol dikhawatirkan etanol yang menghambat bakteri, karena etanol mempunyai kemampuan dalam menghambat bakteri.

## **7. Fraksinasi**

Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang 10 gram ekstrak daun wangon kemudian dilarutkan dengan pelarut air 75 ml, difraksi 3 kali dengan pelarut *n*-heksana masing-masing 75 ml, dalam proses fraksinasi dengan corong pisah, fase *n*-heksana terletak di atas dan fase air terletak di bawah. Fraksi *n*-heksana yang didapat dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada suhu  $50^{\circ}C$ . Residu yang didapat dari fraksi *n*-heksana dilanjutkan fraksinasi 3 kali dengan pelarut etil asetat masing masing 75 ml. Hasil yang didapat adalah fraksi etil asetat yang terletak di atas dan fraksi air yang di bawah kemudian dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada suhu  $50^{\circ}C$  sedangkan fraksi air dipekatkan dalam penangas air.

## 8. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk, ekstrak dan fraksi.

**8.1 Flavonoid.** Identifikasi flavonoid dilakukan menggunakan *Shinoda test* dengan cara 2 mL bahan uji ditambahkan air panas secukupnya, kemudian dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Pembentukan intensitas warna kuning, merah atau jingga menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Harborne 1996).

**8.2 Tanin.** Identifikasi tanin dilakukan menggunakan tes besi (III) klorida dengan cara 1 mL bahan uji dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah dengan beberapa tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  10%. Terbetuknya warna biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Jones *et al* 2006).

**8.3 Saponin.** Identifikasi saponin dilakukan menggunakan *foam test* dengan cara sebanyak 0,5 gram bahan uji dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 ml air, lalu dikocok kuat. Jika buih yang terbentuk bertahan selama 10 menit menunjukkan adanya saponin (Tiwari *et al* 2011).

**8.4 Steroid.** Identifikasi steroid dilakukan dengan cara 0,5 gram bahan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 0,5 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asetat anhidrat dan ditetesi dengan 2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat melalui dinding tabung (pereaksi *Lebermann-Burchard*). Hasil positif akan terbentuk warna hijau untuk steroid (Setyowati *et al* 2014).

**8.5 Alkaloid.** Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara 0,5 gram bahan uji dilarutkan dengan larutan HCl kemudian disaring. Larutan filtrat dibagi menjadi 2 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan reagen reagen Meyer, terbentuk endapan kuning menunjukkan adanya alkaloid. Tabung kedua ditambahkan reagen dragendorff, terbentuk endapan merah menunjukkan adanya alkaloid (Tiwari *et al* 2011).

**8.6 Glikosida.** Identifikasi glikosida dilakukan menggunakan tes modifikasi Borntrager dengan cara 0,5 gram bahan uji dilarutkan dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  dan direndam dalam air mendidih selama 5 menit. Campuran didinginkan dan diekstraksi dengan benzena sama banyak. Lapisan benzena dipisahkan dengan

cara ditambahkan larutan amoniak. Terbentuknya warna merah muda pada lapisan amoniak menunjukkan adanya glikosida (Tiwari *et al*, 2011).

**8.7 Protein.** Identifikasi protein dilakukan menggunakan test xantoprotein dengan cara 0,5 gram bahan uji dilarutkan dengan larutan asam nitrat pekat. Terbentuknya warna kuning menunjukkan adanya protein (Tiwari *et al* 2011).

**8.8 Karbohidrat.** Identifikasi karbohidrat dilakukan menggunakan tes fehling dengan cara 0,5 gram bahan uji dilarutkan dalam aquadest kemudian dipanaskan dengan penambahan larutan fehling A dan B. Terbentuknya endapan merah menunjukkan adanya karbohidrat (Ayoola *et al* 2008).

## **9. Sterilisasi**

Bahan dan peralatan yang digunakan dalam penelitian harus dalam keadaan steril. Cawan petri, pipet, tabung reaksi dan labu disterilkan dengan udara panas (oven). Alat penanaman bakteri (ose) disterilkan dengan pembakaran, yaitu dengan membakarnya sampai membara dengan lampu spiritus. Media dan alat-alat gelas disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit tekanan 1-2 atm.

## **10. Identifikasi Bakteri**

**10.1 Identifikasi bakteri secara goresan.** Identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan inokulasi secara streak gores pada media PSA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Penampakan membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen berwarna kehijauan pada media PSA menunjukkan positif *Pseudomonas aeruginosa* (Jawet *et al* 2007)

**10.2 Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram.** Identifikasi mikroskopis bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan cara pengecatan Gram. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui struktur dan morfologi bakteri. Pertama dibuat apusan di atas objek glass, kemudian difiksasi. Selanjutnya ditetesi pewarna Gram A yang berisi Kristal violet selama 1 menit, kemudian dibilas dan dilanjutkan dengan ditetesi pewarna Gram B yang berisi lugol iodine sebagai mordant selama 1 menit. Setelah itu dibilas kembali dan

lanjutkan ditetesi dengan pewarna Gram C sebagai peluntur selama 30 detik kemudian dibilas. Terakhir ditetesi dengan pewarna Gram D yang berisi safranin selama 1 menit kemudian dicuci dan dikering anginkan, setelah kering amati dengan mikroskop, jika didapat hasil berbentuk batang dan berwarna merah maka hasil pewarnaan menunjukkan bakteri Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**10.3 Uji Biokimia.** Uji biokimia dilakukan untuk mengetahui sifat fisiologi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Pengujian bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan menggunakan media SIM, KIA, LIA, sitrat.

Pertama, media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri. Identifikasi dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kemudian ditusukkan pada media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Pengamatan dilakukan setelah media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Pembacaan hasil uji SIM untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yaitu uji sulfida (-) ditandai dengan tidak terdapat warna hitam pada media, uji indol (-) ditandai dengan terbentuk warna merah pada bagian atasnya ditambahkan reagen *erlich*, uji motilitas (+) ditandai dengan adanya pertumbuhan bakteri yang menyebar di media.

Kedua, media KIA (*Klinger Iron Motility*). Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Identifikasi dilakukan dengan cara biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasikan pada media dengan cara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yaitu lereng berwarna merah (K), dasar media berwarna merah (K) dan sulfida (S-) ditandai dengan tidak terbentuk warna hitam pada media KIA.

Ketiga, media LIA (*Lisis Iron Agar*). Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi dari hasil sulfida. Cara identifikasi dengan biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Pembacaan hasil uji LIA untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yaitu lereng berwarna ungu (K), dasar

media berwarna ungu (K) dan sulfida (S-) ditandai dengan tidak terbentuk warna hitam pada media LIA.

Kempat, media sitrat. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Identifikasi dilakukan dengan cara biakan bakteri diinokulasikan pada media sitrat dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Pembacaan hasil uji sitrat untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yaitu sitrat (+) ditandai dengan terbentuknya warna biru pada media sitrat.

### **11. Pembuatan larutan standar kekeruhan Mc Farland**

Larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36 N sebanyak 9,5 ml dicampurkan dengan BaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 1,175 sebanyak 0,5 ml dalam tabung reaksi. Tabung reaksi dikocok sampai terbentuk larutan dengan kekeruhan 0,5 setara dengan 1,5X10<sup>8</sup> cfu/mL. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan bakteri untuk uji difusi dan dilusi (Lay 1994)

### **12. Pembuatan biakan dan suspensi bakteri**

Bakteri uji diambil dari biakan murni ±2 ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi 10 mL media BHI, kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kekeruhan yang terjadi disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah 1,5X10<sup>8</sup> cfu/mL. Tujuan disesuaikannya suspensi bakteri uji dengan standar Mc Farland 0,5 adalah untuk mengetahui jumlah bakteri yang digunakan selama penelitian dan untuk mengurangi kepadatan bakteri pada saat pengujian difusi dan dilusi.

### **13. Pembuatan larutan uji**

Dibuat larutan uji konsentrasi 50% dengan cara ditimbang 1,5 gram ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun wangen kemudian masing-masing dilarutkan dalam larutan DMSO 1% hingga volume tepat 3 mL ke dalam vial yang sebelumnya telah dikalibrasi. Dari konsentrasi 50% kemudian di encerkan menjadi konsentrasi 25% dan 12,5%.



#### **14. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi-fraksi daun wangon (*Olax scandens* Roxb).**

Ekstrak etanol 96% daun wangon secara soxhletasi diuji secara mikrobiologi terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi untuk mengetahui diameter zona hambat dan metode dilusi untuk mengetahui KHM dan KBM.

Metode difusi dilakukan dengan cara suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang sudah distarakan dengan standar Mc Farlan 0,5 dioleskan secara merata pada media MHA (*Muller Hinton Agar*) dengan menggunakan kapas lidi steril, kemudian didiamkan selama 10 menit agar suspensi biakan terdifusi ke media. Pada media tersebut diletakan 6 kertas cakram dengan berbagai konsentrasi menggunakan pinset dengan jarak yang sama di atas permukaan media. Pada masing-masing cakram sudah diberi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air sebagai agen antibakteri, siprofloksasin sebagai kontrol positif dan larutan DMSO 1% sebagai kontrol negatif. Konsentrasi ekstrak dan fraksi-fraksi dari ekstrak etanol daun wangon dibuat dengan konsentrasi masing-masing 12,5%, 25%, dan 50% kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Daya hambat diukur dari diameter daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram disk. Pengujian dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali, kemudian pengujian dilanjutkan dengan metode dilusi untuk mengetahui KHM dan KBM.

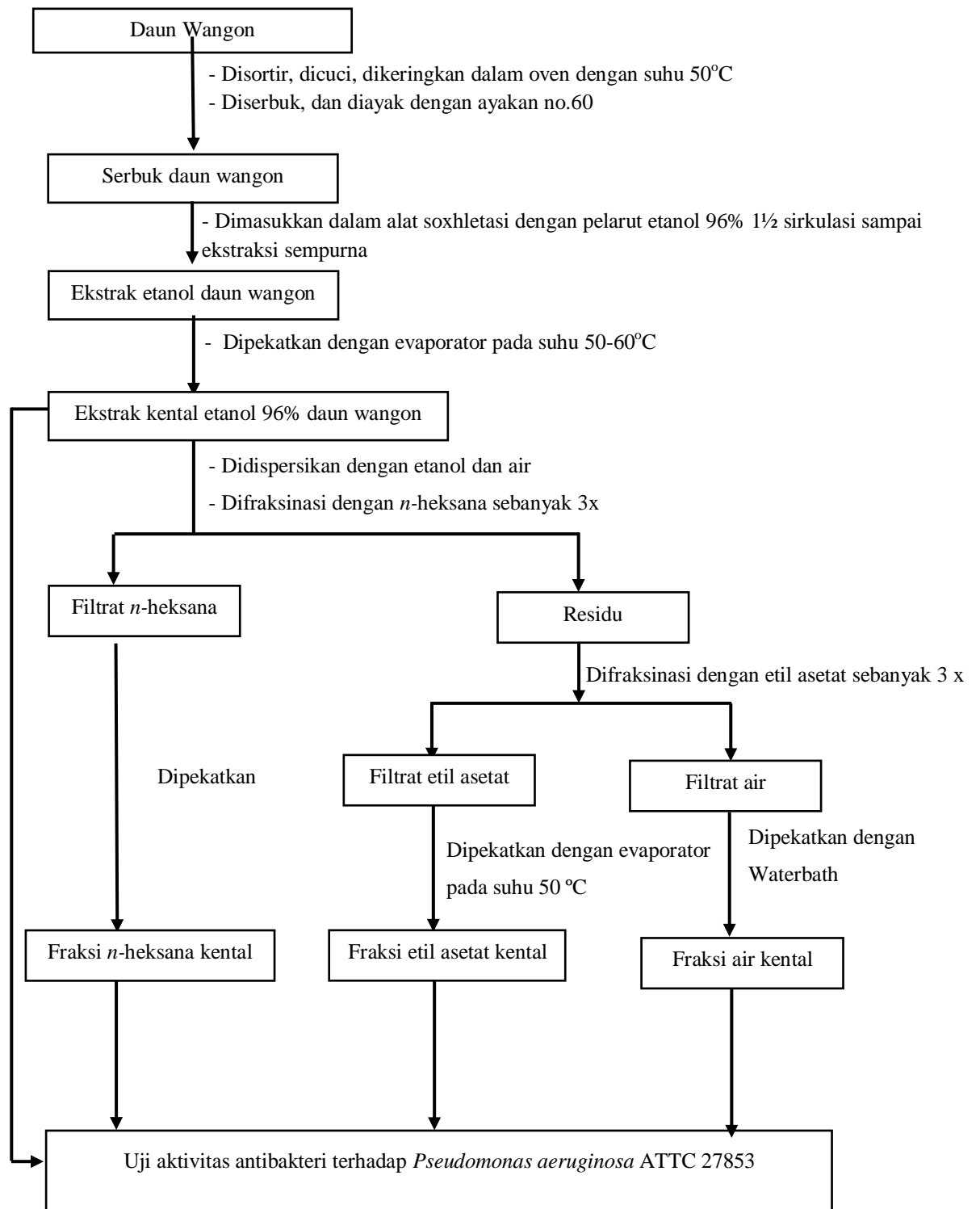
Metode dilusi dilakukan dengan memasukan media BHI ke dalam masing-masing tabung reaksi kecuali tabung 1,2 dan tabung 12. Tabung 1 sebagai kontrol negatif berisi 2 mL ekstrak etanol daun wangon konsentrasi yang paling aktif dan tabung 12 sebagai kontrol positif berisi 1 mL suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan 1 mL medium BHI. Tabung 2 sampai 11 mempunyai variasi konsentrasi yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,562%, 0,781%, 0,391%, 0,195%, 0,098%. Medium BHI 1 mL dimasukkan ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptis dari tabung tiga sampai tabung sebelas. Tabung kedua ditambahkan 1 mL ekstrak etanol daun wangon konsentrasi 50%, Tabung ketiga ditambahkan 1 mL ekstrak etanol daun wangon konsentrasi 50%

kemudian dari tabung ketiga diambil 1 mL dimasukkan ke dalam tabung keempat, kemudian dari tabung keempat diambil 1 mL dimasukkan ke dalam tabung kelima, dan begitu seterusnya sampai tabung kesebelas. Suspensi bakteri yang berada di dalam medium BHI dimasukkan ke dalam tabung dua sampai tabung kesebelas sebanyak 1 mL. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, lalu diamati kekeruhannya. KHM ditentukan dengan cara menentukan konsentrasi terkecil pada tabung yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri (larutan jernih). KBM ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media PSA diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada permukaan media. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terkecil pada media PSA yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh. Pengujian dilakukan 3 kali replikasi.

#### **E. Teknik pengumpulan data dan analisis data**

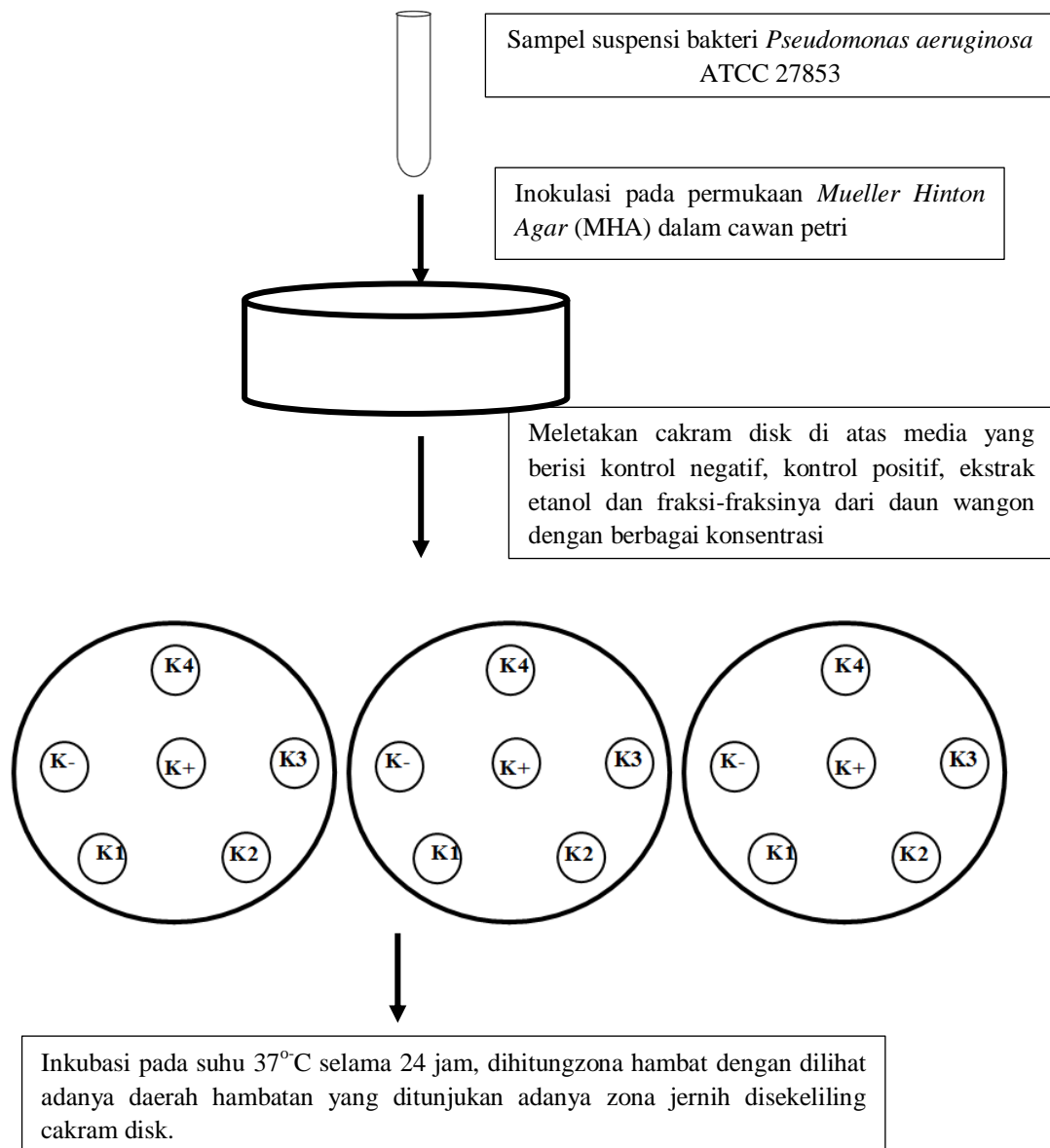
Pengumpulan data dilakukan dengan cara mengukur diameter zona hambat dilihat dari adanya daerah hambatan pertumbuhan bakteri uji yang ditunjukkan dengan adanya zona bening dari masing-masing konsentrasi setelah 18-24 jam masa inkubasi. Diameter diukur secara horizontal dan vertikal. Kedua diameter tersebut ditambahkan dan dihitung nilai rata-ratanya sehingga didapatkan nilai diameter zona hambat.

### F. Skema Penelitian



Gambar 2. Skema pembuatan Ekstrak daun wangon

**Biakan murni *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus***



Keterangan :

K+ = kontrol positif (+)

K- = kontrol negatif (-)

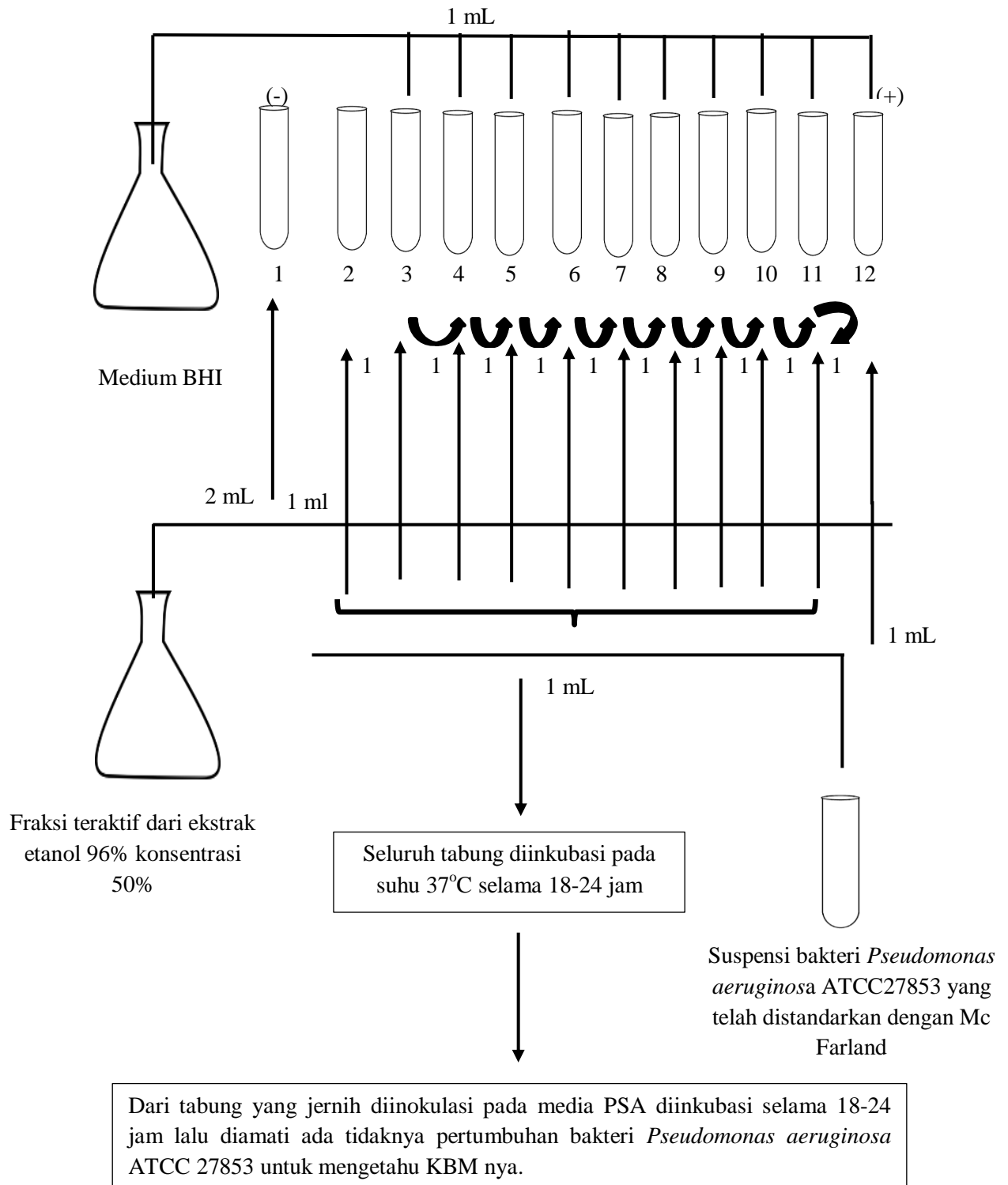
K1 = ekstrak 12,5%, 25%, 50%

K2 = fraksi *n*-heksana 12,5%, 25%, 50%

K3 = fraksi etil asetat 12,5%, 25%, 50 %

K4 = fraksi air 12,5%, 25%, 50 %

**Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun wangen terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode difusi**



**Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun wangen terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode dilusi.**

## BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

### A. Tanaman Wangon (*Olax scandens* Roxb.)

#### 1. Hasil determinasi tanaman wangon

Determinasi tanaman merupakan langkah awal yang dilakukan pada suatu penelitian menggunakan sampel berupa tanaman dan bagian dari tanaman tersebut. Identifikasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menyesuaikan ciri morfologi tanaman, dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Identifikasi tanaman wangon (*Olax scandens* Roxb.) dilakukan di Fakultas MIPA Laboratorium Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta. Berdasarkan hasil determinasi dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman wangon (*Olax scandens* Roxb.). Keterangan identifikasi tanaman yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

#### 2. Pengumpulan dan pengeringan daun wangon

Tanaman wangon yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh secara acak dari daerah persawahan di Dusun Pare, Desa Baleharjo, Kecamatan Sukodono, Kabupaten Sragen, Jawa Tengah pada bulan desember 2017. Daun diambil dalam kondisi yang masih segar, tidak busuk, belum berubah warna hijau pada daunnya dan bersih dari kotoran, mikroba serta ulat.

Daun wangon yang telah diambil kemudian dilakukan pembersihan untuk menghilangkan kotoran pada daun dengan dicuci dengan air bersih yang mengalir. Daun kemudian ditiriskan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50<sup>0</sup>C selama 5 hari. Data rendemen berat daun kering terhadap berat basah daun wangon dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah**

Berat basah (Kg)	Berat kering (Kg)	Rendemen (b/b)
2,1	1,2	57,14%

Rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah yang diperoleh sebesar 57,14 %. Hal ini karena daun wangon diduga memiliki kandungan air

yang kecil sehingga penyusutan pada saat pengeringan tidak terlalu besar. Pengeringan harus dijaga pada suhu konstan 50°C dalam oven, karena bila suhunya terlalu tinggi maka kemungkinan terjadi kerusakan senyawa aktif dan bila suhu terlalu rendah maka pengeringan menjadi tidak sempurna dan waktu yang dibutuhkan untuk proses pengeringan semakin lama akibatnya terjadi proses pembusukan (DepKes RI 2008).

Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air sampai pada titik tertentu yang menyebabkan enzim-enzim menjadi tidak aktif, mencegah pertumbuhan jamur, dan memperpanjang waktu pemakaian sehingga dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama (DepKes RI 2008). Perhitungan rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah dapat dilihat pada lampiran 11.

### 3. Pembuatan serbuk daun wangon

Daun wangon yang telah dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C sampai kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan nomer 60. Nomer mesh 60 termasuk dalam derajat halus sehingga akan mempermudah dalam proses penyarian zat aktif. Ukuran partikel serbuk berpengaruh terhadap rendemen ekstrak. Kontak yang luas antara serbuk dan pelarut diduga akan memberikan kesempatan yang lebih besar dalam mengekstrasi zat aktif yang terdapat pada serbuk (Maulida *et al* 2015). Hasil dari pembuatan serbuk dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Rendemen berat serbuk terhadap berat daun kering**

Berat kering (Kg)	Berat serbuk (Kg)	Rendemen (b/b)
1,2	1,15	95,83%

Berat daun kering sebanyak 1,2 Kg dalam kondisi kering diblender kemudian dijadikan serbuk dan diperoleh serbuk halus seberat 1,15 Kg sehingga diperoleh rendemen sebesar 95,85%. Pengurangan jumlah serbuk yang dihasilkan diduga karena pada saat proses penyerbukan ada beberapa serbuk yang menempel pada alat. Pembuatan serbuk ini bertujuan untuk memperluas permukaan dari partikel bahan bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat

berlangsung efektif. Perhitungan rendeman berat serbuk terhadap berat daun kering dapat dilihat pada lampiran 12.

#### 4. Hasil penetapan kandungan lembab serbuk daun wangon

Serbuk daun wangon sebanyak 2 g, diukur kandungan lembab dengan menggunakan alat *moisture balance*. Kandungan lembab yang terlalu tinggi pada serbuk memudahkan pertumbuhan jamur dan bakteri serta perubahan kimiawi yang dapat merusak serbuk. Hasil penetapan kandungan lembab serbuk daun wangon dapat dilihat pada tabel 3

**Tabel 3. Hasil penetapan kandungan lembab serbuk daun wangon**

Serbuk	Penimbangan (g)	Kandungan lembab (%)
Daun Wangon	2,0	7,8
	2,0	8,0
	2,0	8,0
Rata-rata	2,0	7,9

Hasil penetapan dari kandungan lembab serbuk daun wangon menunjukkan persentase rata-rata daun wangon sebesar 7,9 %. Kadar lembab memenuhi syarat dimana serbuk tidak boleh lebih dari 10% karena dengan kadar lembab kurang dari 10% sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tidak tumbuh sehingga bahan serbuk lebih awet (DepKes RI 2008).

#### 5. Hasil pembuatan ekstrak daun wangon

Metode pembuatan ekstrak pada penelitian ini dengan menggunakan cara soxhletasi. Ekstraksi dengan soxhletasi dipilih karena memberikan keuntungan dibandingkan dengan proses lainnya. Proses ekstraksi dengan metode soxhletasi menghasilkan ekstrak yang pekat dan baik karena serbuk akan selalu terbasahi oleh pelarut murni hasil kondensasi cairan penyari dan berlangsung kontinyu, tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak membutuhkan waktu yang lama. Proses pemanasan antara pelarut dan bahan organik selama proses ekstraksi dapat memperbaiki kualitas ekstrak yang dihasilkan. Cairan penyari yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan etanol 96%. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, kurkumin, antrakuinon, flavonoid, steroid, dan klorofil (Depkes 2005), etanol juga dapat menghambat kerja enzim sehingga terhindar dari proses hidrolisis dan oksidasi (Voight 1994).



Proses soxhletasi dilakukan dengan menggunakan alat soxhlet yang terdiri dari kondensor, ekstraktor dan labu penampung. Serbuk dari simplisia daun wangen ditimbang sebanyak 50 gram kemudian dimasukkan ke dalam selongsong yang terbuat dari kertas saring. Serbuk yang sudah dimasukkan ke dalam selongsong kemudian dimasukkan ke dalam ekstraktor dan ditambahkan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1½ sirkulasi. Prinsip metode ekstraksi soxhletasi adalah pemanasan dan perendaman sampel. Hal itu menyebabkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Dengan demikian, metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut ke dalam pelarut organik. Larutan itu kemudian menguap ke atas dan melewati pendingin udara (kondensor) yang akan mengembunkan uap tersebut menjadi tetesan yang akan terkumpul ke dalam ekstraktor. Bila larutan melewati batas lubang pipa samping ekstraktor maka akan terjadi sirkulasi dan larutan akan masuk ke dalam labu penampung. Sirkulasi yang berulang itulah yang menghasilkan ekstrak yang baik dan pekat. Proses soxhletasi dihentikan ketika sudah mencapai 10 sirkulasi karena pelarut yang digunakan untuk ekstraksi sudah tidak berwarna pekat lagi. Data hasil pembuatan ekstrak etanol daun wangen dapat dilihat tabel 4.

**Tabel 4. Rendemen ekstrak daun wangen**

serbuk (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (b/b)
350,00	47,80	13,66 %

Berasarkan tabel 4 dapat dilihat bahwa persentase rendemen ekstrak etanol daun wangen dari serbuk simplisia sebanyak 350,00 gram yang dilarutkan dengan pelarut etanol 96% didapatkan ekstrak kental 47,80 gram sehingga diperoleh rendemen ekstrak sebesar 13,66 %. Hasil perhitungan persen rendemen ekstrak etanol daun wangen dapat dilihat di lampiran 13.

## **6. Hasil uji bebas etanol daun wangen**

Ekstrak kental daun wangen dilakukan uji bebas etanol dengan cara esterifikasi alkohol.

Tabel 5. Uji bebas etanol daun wangon

Uji bebas etanol	Hasil pengujian
5 tetes ekstrak kental daun wangon + 5 tetes asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) + 2 tetes asam sulfat pekat ( $\text{H}_2\text{SO}_4\text{conc}$ ), dipanaskan	Tidak tercium bau ester etil asetat

Tabel 5. Menunjukkan bahwa ekstrak daun wangon sudah bebas etanol yang ditandai tidak terbentuknya bau ester etil asetat dari reaksi esterifikasi yang dilakukan. Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui bahwa ekstrak kental yang didapat sudah bebas dari pelarut etanol. Dengan demikian, daya hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antibakteri, murni karena adanya aktivitas antibakteri pada senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol daun wangon dan tidak dipengaruhi oleh pelarut etanol 96% sebagai pelarut pengekstraksi.

#### 7. Hasil fraksinasi ekstrak daun wangon

Fraksinasi adalah suatu cara untuk memisahkan golongan utama kandungan satu dari golongan utama lainnya berdasarkan kepolarannya. Proses fraksinasi dilakukan dengan menggunakan alat corong pisah. Prinsip corong pisah adalah memisahkan zat atau senyawa tertentu yang terdapat dalam sampel berdasarkan perbedaan berat jenis antara dua fase pelarut yang tak saling campur. Pelarut yang digunakan pada proses fraksinasi adalah *n*-heksana, etil asetat dan air. *n*-Heksana sebagai pelarut non polar akan menarik senyawa-senyawa yang bersifat non polar seperti minyak atsiri, terpenoid, triterpenoid, alkaloid, klorofil dan resin. Etil asetat sebagai pelarut semi polar akan menarik senyawa-senyawa yang bersifat semi polar seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin. Air sebagai pelarut polar akan menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar seperti antosianin, tanin, saponin, glikosida dan gula.

Fraksinasi dilakukan sebanyak 3x pengulangan sampai pelarut berwarna bening mendekati semula. Setelah diperoleh hasil maka proses yang selanjutnya dilakukan adalah mengentalkan fraksi – fraksi tersebut. Untuk fraksi *n*-heksan dan etil asetat suhu yang digunakan adalah  $50^{\circ}\text{C}$ . Hal ini dilakukan agar hanya pelarut *n*-heksan dan etil asetat saja yang menguap dan agar senyawa aktif yang ditarik

oleh *n*-heksan dan etil asetat tidak rusak, karena bila menggunakan suhu yang tinggi dikhawatirkan akan merusak kandungan senyawa aktif yang ditarik oleh pelarut tersebut. Untuk fraksi air, suhu yang digunakan cukup tinggi yaitu dengan menggunakan penangas air pada suhu didihnya yaitu 100<sup>0</sup>C.

Hasil penyarian dari ketiga pelarut tersebut yang akan digunakan dalam penelitian. Hasil dari proses fraksinasi menunjukkan bahwa ekstrak dari daun wangon lebih banyak larut pada pelarut air. Hal ini disebabkan karena diduga sebagian besar senyawa yang terdapat pada daun wangon bersifat polar. Hasil Perhitungan persen rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak daun wangon dapat dilihat pada lampiran 13. Data hasil dari pembuatan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak daun wangon dapat dilihat pada tabel berikut.

**Tabel 6. Rendemen hasil fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak daun wangon**

Bobot ekstrak (g)	Jenis pelarut	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
33,11	<i>n</i> -heksana	2,96	8,81
33,11	Etil asetat	5,59	16,90
33,11	Air	18,76	56,65

Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat bahwa perhitungan persentase rata-rata fraksi air daun wangon menghasilkan rendemen yang paling besar, karena senyawa polar lebih banyak terkonsentrasi pada fraksi air. Tingginya rendemen fraksi pada pelarut polar disebabkan karena makromolekul gula sederhana seperti monosakarida dan oligosakarida ikut terlarut dalam pelarut polar namun tidak larut dalam pelarut non polar (Nur dan Astawan 2011). Hal ini menyebabkan rendeman pada fraksi air paling besar namun pada fraksi *n*-heksana paling rendah. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun wangon selengkapnya dapat dilihat dalam lampiran 13

## **8. Hasil identifikasi kandungan senyawa ekstrak dan fraksi-fraksi daun wangon**

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif untuk mengidentifikasi kandungan kimia yang terkandung dalam ekstrak dan masing-masing fraksi dari ekstrak etanol daun wangon. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun wangon dilakukan dengan metode tabung.

Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun wangon dapat dilihat pada tabel berikut :

**Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstraks, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun wangon secara kualitatif**

Senyawa kimia	Pustaka	Interpretasi hasil Fraksi			
		n-Heksana	Etil asetat	air	Ekstrak
<b>Flavonoid</b>	Terbentuk intesitas warna kuning, merah atau jingga (Harborne 1996)	(-) terbentuk warna hijau	(+) terbentuk warna merah	(+) terbentuk warna merah	(+) terbentuk warna jingga
<b>Tanin</b>	Terbentuk warna hijau kehitaman (Jones <i>et al</i> 2006)	(-) tidak terbentuk warna hijau kehitaman	(+) terbentuk warna hijau kehitaman	(+) terbentuk warna hijau kehitaman	(+) terbentuk warna hijau kehitaman
<b>Saponin</b>	Terbentuk buih yang bertahan selama 10 menit (Tiwari <i>et al</i> 2011)	(+) terbentuk buih yangbetahan selama 10 menit	(+) terbentuk buih yangbetahan selama 10 menit	(+) terbentuk buih yangbetahan selama 10 menit	(+) terbentuk buih yangbetahan selama 10 menit
<b>Steroid</b>	Terbentuk warna hijau (Setyowati <i>et al</i> 2014)	(+) terbentuk warna hijau	(+) terbentuk warna hijau	(-) terbentuk warna kuning	(+) terbentuk warna hijau
<b>Alkaloid</b>	Terbentuk endapan merah pada reagen Dagendorff dan terbentuk endapan kuning pada reagen Mayer (Tiwari <i>et al</i> 2011)	(-)Tidak terbentuk endapan merah pada reagen Dagendorff dan terbentuk endapan kuning pada reagen Mayer	(-)Tidak terbentuk endapan merah pada reagen Dagendorff dan terbentuk endapan kuning pada reagen Mayer	(-)Tidak terbentuk endapan merah pada reagen Dagendorff dan terbentuk endapan kuning pada reagen Mayer	(-)Tidak terbentuk endapan merah pada reagen Dagendorff dan terbentuk endapan kuning pada reagen Mayer
<b>Protein</b>	Terbentuk warna kuning menunjukkan adanya protein (Tiwari <i>et al</i> 2011)	(-) terbentuk warna jingga	(-) terbentuk wana jingga	(-) terbentuk warna merah	(-) terbentuk warna merah
<b>Karbohidrat</b>	Terbentuk endapan merah menunjukkan adanya karbohidrat (Ayoola <i>et al</i> 2008)	(-) tidak terbentuk endapan merah	(+) terbentuk endapan merah	(+) terbentuk endapan merah	(+) terbentuk endapan merah

Keterangan : + : ada senyawa  
- : tidak ada senyawa

Berdasarkan tabel 7 dapat dilihat bahwa hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun wangon positif mengandung flavonoid, saponin, tanin, flavonoid, steroid dan karbohidrat; fraksi *n*-heksana mengandung steroid, flavonoid dan saponin; fraksi etil asetat mengandung flavonoid, tanin, steroid, karbohidrat dan saponin; sedangkan fraksi air mengandung flavonoid, tanin, karbohidrat dan saponin. Senyawa kimia tanin, steroid, saponin dan flavonoid diduga memiliki aktivitas antibakteri.

Uji fitokimia ekstrak, fraksi etil asetat dan air menggunakan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  menunjukkan hasil positif mengandung tanin. Hal ini dapat dilihat dari perubahan warna yang terjadi pada saat penambahan larutan  $\text{FeCl}_3$  yaitu warna kehitaman. Hal ini terjadi karena adanya reaksi reduksi. Tanin merupakan golongan senyawa polifenol, dimana jika direaksikan dengan  $\text{FeCl}_3$  maka akan mampu mereduksi besi (III) menjadi besi (II) (Budini *et al* 1980). Selain itu Harborne (2007) menyatakan bahwa cara untuk mendeteksi adanya senyawa fenol, yaitu dengan menambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  1% dalam air akan menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam.

Uji fitokimia ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yang direaksikan dengan aquades terbukti mengandung senyawa saponin. Hal ini dapat terlihat dari busa stabil yang dihasilkan. Timbulnya busa pada uji saponin dikarenakan sifat saponin yang dapat menurunkan tegangan permukaan air (Ilyani 2002).

Uji fitokimia ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yang direaksikan dengan magnesium dan asam klorida terbukti mengandung senyawa flavonoid. Penambahan serbuk magnesium dan asam klorida akan menyebabkan tereduksinya senyawa flavonoid yang ada sehingga menimbulkan reaksi warna merah yang merupakan ciri adanya flavonoid (Robinson 2011).

Uji fitokimia ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yang direaksikan dengan kloroform, asetat anhidrat dan asam sulfat pekat terbukti mengandung steroid. Hal ini terjadi karena senyawa sterodi akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam yang memberikan sejumlah reaksi warna (Paul 2002).

Uji fitokimia ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yang direaksikan dengan reagen Fehling A dan Fehling B terbukti mengandung senyawa karbohidrat. Hal ini terjadi karena adanya senyawa aldehida yang teroksidasi pada karohidrat yang dapat menghasilkan warna merah bata.

Uji fitokimia ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yang direaksikan FeCl<sub>3</sub>, benzena dan amoniak terbukti menunjukkan adanya senyawa glikosida.

## **9. Hasil identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 257853**

**8.1. Identifikasi bakteri secara goresan.** Identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan inokulasi secara goresan pada media PSA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil penampakan pada media PSA membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen berwarna kehijauan yang menunjukkan positif *Pseudomonas aeruginosa*. Pigmen warna hijau disebabkan karena *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan pioverdin yang menghasilkan warna kehijauan pada agar (Jawet *et al* 2007)

**8.2. Uji identifikasi mikroskopis.** Identifikasi mikroskopis *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 257853 dilakukan dengan cara pengecatan Gram. Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui pengelompokan bakteri yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan 4 jenis reagen yaitu Gram A (Kristal Violet), Gram B (Iodine), Gram C (Alkohol) dan Gram D ( Safranin). Pada pewarnaan Gram, bakteri yang telah difiksasi akan membentuk noda pada kaca obyek dengan pewarnaan Gram A, selanjutnya pewarna dicuci dibawah air mengalir dan pada noda spesimen ditetesi reagen Gram B yang merupakan pewarna *mordant*. Setelah reagen Gram B dicuci, baik bakteri Gram negatif maupun bakteri gram positif akan berwarna ungu. Pewarnaan dilanjutkan dengan reagen Gram C yang merupakan senyawa peluntur warna yang pada bakteri Gram negatif akan menghilangkan warna ungu dari sel. Setelah reagen Gram C dicuci, pewarnaan dilanjutkan dengan reagen Gram D yang merupakan pewarna basa berwarna merah. Hasil pengecatan Gram yang dilakukan kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100X pada lensa obyektif dengan bantuan minyak emersi. Hasil pengamatan dibawah

mikroskop menunjukkan bahwa bakteri berbentuk batang dan berwarna merah maka hasil pewarnaan menunjukkan positif bakteri Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*. Warna merah pada bakteri Gram negatif disebabkan oleh rusaknya lapisan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri yang tidak tahan oleh pencucian alkohol (reagen Gram C), sehingga warna cat awal yang merupakan kompleks *crystal violet-iodine* dan warna safranin yang berwarna merah mampu menyelimuti dinding peptidoglikan (Pratiwi 2008). Hasil pengecatan Gram dapat dilihat pada lampiran 7.

**8.3. Uji Biokimia.** Uji biokimia pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan menggunakan media SIM, KIA, LIA, SITRAT. hasil uji biokimia pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat pada berikut dan lampiran 7.

**Tabel 8. Hasil pengujian biokimia bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Media	Pustaka	Hasil
SIM	Lereng media sulfida tidak berwarna hitam (-), tidak terdapat cincin indol berwarna merah (-) dan ada bakteri yang menyebar (+)	- - +
KIA	Lereng media atas berwarna merah (K), bawah berwarna merah (K) dan tidak ada warna hitam (S-)	K/K (S-)
LIA	Lereng media atas berwarna ungu (K), bawah berwarna ungu (K) dan tidak ada warna hitam (S-)	K/K (S-)
SITRAT	Terjadi perubahan warna menjadi biru (+)	+

Pada media SIM didapatkan hasil pada media tidak terdapat warna hitam (S-) artinya *Pseudomonas aeruginosa* tidak mampu mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfida sehingga media tidak berwarna hitam. Uji indol negatif artinya tidak terbentuk cincin indol yang berwarna merah muda setelah ditetaskan reagen erlich A dan erlich B karena tidak terjadi pemecahan asam amino triptofan oleh enzim triptopanase menjadi indol dan asam piruvat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak menghasilkan triptopanase, dan motilitas positif artinya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* bersifat motil, ditunjukkan dengan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

menyebar keseluruh medium. Pada media KIA didapatkan hasil lereng bawah dan atas berwarna merah (K/K) yang menunjukkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak memfermentasi karbohidrat (glukosa dan laktosa) dan tidak terdapat warna hitam sebagai tanda tidak terjadi pembentukan sulfida (S-) artinya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak memproduksi H<sub>2</sub>S. Pada media LIA didapatkan hasil bahwa lereng bawah dan atas berwarna ungu (K/K) artinya bakteri tidak mendeaminasi lysin dan tidak terdapat warna hitam sebagai tanda tidak terjadi pembentukan sulfida (S-) artinya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak memproduksi H<sub>2</sub>S. Pada media Citrat didapatkan hasil media berwarna biru (citrat+ ) artinya bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Penggunaan sitrat sebagai sumber karbon memerlukan dua enzim utama yaitu enzim citrate permease (*citrate transport protein*) sebagai enzim yang mentransport sitrat melewati dinding sel ke dalam sitoplasma sel bakteri, serta enzim citritase atau citrate lyase yang berperan memecah sitrat menjadi asetat dan oksaloasetat (Muhaimin *et al* 2013). Oksaloasetat selanjutnya dimetabolisme oleh enzim oksaloasetat dehidrogenase menjadi piruvat dan karbondioksida (CO<sub>2</sub>). Piruvat akan dimanfaatkan oleh bakteri menjadi energi sedangkan karbondioksia (CO<sub>2</sub>) bereaksi dengan ion natrium dan air dalam media sehingga menghasilkan suatu senyawa basa yaitu natrim karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Natrium karbonat yang terbentuk menyebabkan pH meningkat yang menyebabkan suasana berubah menjadi basa, dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. Hal ini terjadi karena pada media citrat mengandung indikator *bromo thymol blue* (BTB) yang merupakan indkator pH (Muhaimin *et al* 2013).

#### **10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara difusi**

Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dilakukan dengan cara menempelkan kertas cakram yang telah berisi ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air ke atas permukaan media MHA yang telah di tumbuhkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Aktivitas antibakteri ditentukan dengan mengukur zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram. Masing-masing zat uji memiliki konsentrasi 12,5% ; 25% ; 50% b/v dengan DMSO 1%



sebagai pengencer. DMSO 1% digunakan sebagai kontrol negatif dan siprofloksasin 5 $\mu$ g sebagai kontrol positif. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dari daun wangon terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat pada tabel 9

**Tabel 9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dari daun wangon terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Sampel	Diameter Zona Hambat (mm)			Rata-rata $\pm$ SD
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
<b>Konsentrasi 50%</b>				
Ekstrak	11,6	12	11	11,53 $\pm$ 0,5
Fraksi <i>n</i> -Heksana	8,9	8	8	8,30 $\pm$ 0,52
Fraksi Etil Asetat	13,5	13	13,2	13,23 $\pm$ 0,25
Fraksi Air	12,4	12,1	12,6	12,36 $\pm$ 0,25
<b>Konsentrasi 25%</b>				
Ekstrak	9,8	9	9	9,26 $\pm$ 0,46
Fraksi <i>n</i> -Heksana	7,9	7	7,5	7,47 $\pm$ 0,45
Fraksi Etil Asetat	12,5	12	12	12,17 $\pm$ 0,29
Fraksi Air	10,5	10,6	10,8	10,63 $\pm$ 0,15
<b>Konsentrasi 12,5%</b>				
Ekstrak	7,1	6,6	6,5	6,73 $\pm$ 0,32
Fraksi <i>n</i> -Heksana	6,6	6,5	6,5	6,53 $\pm$ 0,05
Fraksi Etil Asetat	9	8,8	8,7	8,83 $\pm$ 0,15
Fraksi Air	8	7,7	7,3	7,67 $\pm$ 0,35
<b>Kontrol (+)</b>				
siprofloksasin 5 $\mu$ g	31,6	31	31	31,97 $\pm$ 1,19
<b>Kontrol (-) DMSO 1%</b>				
	0	0	0	0

Hasil pengujian di atas menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun wangon mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri paling besar dibandingkan dengan ekstrak, fraksi *n*-heksana dan air. Hal ini disebabkan karena fraksi etil asetat termasuk pelarut semi polar yang dapat melarutkan senyawa flavonoid dan senyawa-senyawa fenolik yang diduga memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Harborne 2007). Ekstrak memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kecil dibandingkan fraksi etil asetat dan air karena diduga kandungan senyawa murni pada daun wangon lebih banyak terdapat pada fraksi etil asetat dan air dibandingkan pada ekstrak. Fraksi *n*-heksana memiliki

aktivitas penghambatan paling kecil dibandingkan ekstrak, fraksi etil asetat dan air karena diduga pelarut *n*-heksana hanya melarutkan sedikit senyawa metabolit sekunder yang bersifat sebagai antibakteri seperti senyawa steroid (Tiwari *et al* 2011). DMSO 1% sebagai kontrol negatif tidak menunjukkan adanya zona hambat. Hal ini membuktikan bahwa DMSO 1 % yang juga digunakan sebagai pelarut tidak berperan dalam pembentukan zona hambat pada ekstrak dan fraksi-fraksinya. Namun demikian penggunaan siprofloksasin sebagai kontrol positif terbukti lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan diameter hambat rata-rata 31,97 mm lebih besar dibandingkan dengan fraksi teraktif (fraksi etil asetat 50%). Hasil difusi dapat dilihat pada lampiran 9.

Menurut kriteria kekuatan daya antibakteri Davis dan Stout (1971) hasil pengukuran daya hambat ekstrak konsentrasi 50%, fraksi etil asetat konsentrasi 50% dan 25%, serta fraksi air konsentrasi 50% dan 25% memberikan daya hambat yang tergolong kuat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 sedangkan pada ekstrak konsentrasi 25% dan 12,%, fraksi etil asetat konsentrasi 12,5%, fraksi air konsentrasi 12,5%, serta fraksi *n*-heksana konsentrasi 50%; 25% dan 12,5% memberikan daya hambat yang tergolong sedang terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853. Penggolongan kekuatan daya antibakteri dari bahan alam didasarkan pada kriteria kekuatan daya antibakteri menurut Davis and Stout (1971) yaitu jika diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat dan zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat.

Hasil uji aktivitas antibakteri pada tabel 9 menunjukkan adanya perbedaan diameter hambat pada masing-masing konsentrasi dimana semakin besar konsentrasi semakin besar pula aktivitas penghambatannya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pelczar dan Chan (1998) bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu ekstrak maka semakin tinggi efek yang ditimbulkan. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun wongon menggunakan metode soxhletasi pada konsentrasi 25% dan 50% berturut-turut menunjukkan diameter hambat sebesar 9,26 mm dan 11,53 mm. Penelitian lain yang dilakukan oleh Majumder *et al* (2015), terhadap

*Pseudomonas aeruginosa* pada ekstrak metanol daun wangon menggunakan metode maserasi menunjukkan diameter hambat sebesar 6,33 mm pada konsentrasi 250 mg/mL. Penelitian yang dilakukan oleh Durraipandiyani *et al* (2006) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* pada ekstrak *n*-heksana daun wangon dengan metode perkolasi pada konsentrasi 5 mg/ disk menunjukkan diameter hambat sebesar 12 mm.

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan zona hambat dengan penelitian yang dilakukan oleh Durraipandiyani *et al* (2006) dan Majumder *et al* (2015). Adanya perbedaan zona hambat tersebut disebabkan karena perbedaan pelarut sehingga akan mempengaruhi kemampuan dalam menarik senyawa-senyawa aktif pada tanaman (Tiwari *et al* 2011), perbedaan metode ekstraksi sehingga akan mempengaruhi mutu ekstrak (Nurhasnawati *et al* 2017), perbedaan tipe kultur bakteri, perbedaan perlakuan selama penelitian, dan jumlah koloni dalam suspensi bakteri yang digunakan selama penelitian.

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan zona hambat lebih besar dibandingkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Majumder *et al* (2015). Hal ini diduga karena pada metode soxhletasi proses penyarian berjalan secara kontinyu, jumlah zat aktif yang tersari lebih sempurna dan ekstrak yang diperoleh lebih pekat. Metode soxhletasi mampu menarik flavonoid total dan fenolik total lebih besar dibandingkan metode maserasi (Rosita *et al* 2017), sehingga mampu menghasilkan zona hambat yang lebih besar. Pelarut etanol lebih selektif dalam melarutkan senyawa aktif pada tanaman dan tidak bersifat toksik pada manusia sehingga diduga lebih efektif dibandingkan pelarut metanol karena pelarut metanol bersifat sitotoksik dan dapat menghasilkan hasil yang salah (Tiwari *et al* 2011). Namun, hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan zona hambat lebih kecil dibandingkan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Durraipandiyani *et al* (2006). Hal ini diduga karena pada metode perkolasi dingin mampu menyari senyawa aktif lebih sempurna karena proses ekstraksi berlangsung lebih lama, perlakuan dalam keadaan dingin sehingga lebih aman untuk senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Verawati *et al* 2017).

Senyawa kimia yang diduga memiliki aktivitas sebagai antibakteri pada daun wangon adalah flavonoid, tanin, steroid dan saponin. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dengan menghambat sintesis asam nukleat dengan cara cincin benzen (B) dari flavonoid membentuk ikatan hidrogen dengan susunan basa asam nukleat dan selanjutnya mengarah pada penghambatan sintesis DNA dan RNA pada bakteri. Selain itu flavonoid juga berikatan dengan subunit GyrB dari DNA gyrase sehingga dapat mengganggu proses replikasi DNA (Cushnie *et al* 2005). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein dinding sel bakteri sehingga dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel bakteri (Azima 2004). Selain itu tanin memiliki kemampuan menghambat kerja enzim DNA topoisomerase sehingga proses replikasi DNA menjadi terganggu (Nuria *et al* 2009). Mekanisme steroid sebagai antibakteri yaitu dengan merusak membran sel bakteri. Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis (Ahmed 2007). Mekanisme saponin sebagai antibakteri yaitu dengan mengganggu permeabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteri menjadi lisis, selain itu saponin juga memiliki sifat lipofilik yang dapat masuk ke lapisan lipid membran sel kemudian mengikat lipid pada membran sel, membentuk senyawa kompleks lipid-saponin sehingga menghancurkan sifat permeabilitas membran sel, menyebabkan pelepasan isi sel dan menimbulkan kematian sel (Permatasari 2013).

#### **11. Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara dilusi**

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui KHM dan KBM dari agen antibakteri yang memiliki daya hambat paling besar dalam hal ini adalah fraksi etil asetat dengan konsentrasi 50%. Penentuan konsentrasi hambat minimum untuk mengetahui konsentrasi minimum dari fraksi teraktif dari ekstrak etanol

96% daun wangen yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini penentuan KHM dilakukan terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan menggunakan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 96% daun wangen konsentrasi 50%. Nilai KHM fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 96% daun wangen dapat ditentukan dengan melihat kekeruhan dan dibandingkan dengan kontrol, KHM ditandai dengan mulai adanya kejernihan secara visual (Pratiwi 2008). Pada penelitian ini, nilai KHM fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 96% daun wangen tidak dapat ditentukan karena fraksi yang digunakan terlalu pekat. Oleh karena itu, untuk mengetahui nilai KBM semua seri pengenceran di inokulasikan pada media PSA. Nilai KBM dari fraksi etil asetat konsentrasi 50% dapat dilihat pada tabel 10.

**Tabel 10. Nilai KBM fraksi teraktif daun wangen terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

No	Konsentrasi (% b/v)	Fraksi etil asetat		
		I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	50	-	-	-
3	25	-	-	-
4	12,5	+	+	+
5	6,25	+	+	+
6	3,125	+	+	+
7	1,562	+	+	+
8	0,781	+	+	+
9	0,390	+	+	+
10	0,195	+	+	+
11	0,097	+	+	+
12	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :

(-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : Ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-) : Larutan stok fraksi etil asetat 50%

Kontrol (+) : Suspensi bakteri

Penentuan KBM untuk mengetahui konsentrasi bunuh minimum dari fraksi teraktif dari ekstrak etanol 96% daun wangen yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Nilai KBM fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 96% daun wangen dapat ditentukan dengan menginokulasikan seri pengenceran larutan uji dari tabung pada media PSA dalam cawan petri, nilai KBM ditandai dengan tidak ada pertumbuhan koloni media

PSA. Dari hasil penelitian diketahui bahwa nilai KBM fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 96% daun wangon sebesar 25 %. Nilai KBM yang diperoleh dapat dijadikan sebagai studi pendahuluan untuk penelitian selanjutnya. Hasil Dilusi dapat dilihat secara pada lampiran 10.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun wangon (*Olax scandens* Roxb) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, Fraksi etil asetat konsentrasi 50% dari ekstrak etanol daun wangon (*Olax scandens* Roxb) mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif daun wangon (*Olax scandens* Roxb) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 25%.

#### **B. Saran**

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri antibakteri daun wangon (*Olax scandens* Roxb) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang diperoleh dari sampel biologis seperti urin atau sputum.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri daun wangon (*Olax scandens* Roxb) terhadap bakteri patogen lain.

Ketiga, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri daun wangon (*Olax scandens* Roxb) dengan metode ekstraksi dan pelarut yang berbeda.

## DAFTAR PUSTAKA

- [Departemen Kesehatan Republik Indonesia]. 2005. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (1)*. Jilid II. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- [Departemen Kesehatan Republik Indonesia]. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia edisi 1*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- [Direktorat Jenderal Pengawasan Obat Dan Makanan]. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- [Direktorat Jenderal Pengawasan Obat Dan Makanan]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma].2016. *Panduan Praktikum Mikrobiologi*. Yogyakarta : Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma
- [Kementerian Kesehatan Republik Indonesia]. 2017. *Data dan Profil Kesehatan Indonesia 2016*. Jakarta : Kementrian Kesehatan RI
- Ahmed SM, Vrushabendra SB, Gopkumar RD & Chandrashekar VM. 2005. Anti-diabetic Activity of Terminalia catappa Linn. Leaf Extracts in Alloxan-induced Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 4: 36-39.
- Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T & Iwatsuki K. 2001. Antibacterial Action of Several Tannin Against Staphylococcus aureus. *Journal Antimicrobial Chemistry*, 48: 487-491.
- Arifianti L, Oktarina RD, & Kusumawati I. 2014. Pengaruh jenis pelarut pengestraksi terhadap kadar sinensetin dalam ekstrak daun *Orthosiphon stamineus* Benth). *E-Journal Planta Husada*, 2(1): 1- 4
- Azima F. 2004. Aktivitas antioksidan dan anti-agregasi platelet ekstrak cassia vera (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Blume) serta potensinya dalam pencegahan aterosklerosis pada kelinci. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Cowan MM. 1999. *Plant Products as Antimicrobial Agents*. Clinical Microbiology reviews Vol. 12 (4)
- Cushnie and Andrew J. Lamb. 2005. Review Antimicrobial Acticity Of Flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agent* 26 (2005) 343-356



- Davis, Stout. 1971. Disc Plate Method Of Microbiological Antibiotic Essay. *Journal Of Microbiology*. Vol 22 No 4.
- Denyer SP, Norman AH, sean PG. 2004. Pharmaceutical Microbiology. 7th. Victoria. Australia: Blackwell. Science. Hall. 346-363.
- Dewi W, Widya AL, Desny SW. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Daun Prasman (*Eupatorium triplinerve* Vahl.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT* Vol. 5 : 2302 – 2493
- Eko. 2009. Wangon. <https://ekoyw.wordpress.com/2009/12/26/wangon/> [diakses tanggal 20 Oktober 2017]
- Farnsworth N. 1996. Biological and Phytochemical Screening of Plant . *Journal of Pharmaceutical Sciences*.5. (3)
- Febryanto MA. 2017. Studi ekstraksi dengan metode soxhletasi pada bahan organik umbi sarang semut (*Myrmecodia pendans*) sebagai inhibitor organik. Surabaya: Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh November.
- Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam:Farmakognosi*, Jilid ke-1 Jakarta : Penebar Swadaya.
- Harborne JB. 1996. *Metode Fitokimia*. Terjemahan: Padmawinata, K dan Soediro, I. Institut Teknologi Bandung:Bandung.
- Harborne JB. 2007. *Metode Fitokimia: Penuntun Dan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan* 4<sup>th</sup>, Kosasih P, Iwang S. Penerjemah; Sofia N, Editor. Bandung: ITB Press. Terjemahan dari : *Phytochemical Methods*.
- Ilyani AS. 2002. Kiat Memilih Deterjen: Banyak Busa Belum Tentu Lebih Bersih. Jakarta: Yayasan Lembaga Konsumen Indonesia (YLKI).
- Indian Medical Plant. <https://link.springer.com/referencework/10.1007/978-0-387-70638-2> [diakses tanggal 20 oktober 2017]
- Jones WP, Kinghorn AD. 2006. Extraction of plant secondary metabolites. In: Sharker SD, Latif Z, Gray AL, eds. natural product isolation. 2nd edition. Humana Press: New Jersey
- Jawetz E. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran edisi 26*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran ECG
- Jayanegara A dan Sofyan A. 2008. Penentuan aktifitas biologis tannin beberapa hijauan secara *in vitro* menggunakan ‘hohenheim gas test’ dengan polietilen glikol sebagai determinan. *Med. Pet.* **31** : 44-52.

- Lay BW. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium Edisi 1*. Jakarta : Raja Grafindo Persada
- Lisa N. 2008. Uji aktivitas in vitro levofloksasin terhadap isolat *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* resisten multiobat di RSUD dr. Soetomo Surabaya: isolat dari pasien infeksi kulit dan infeksi saluran kemih [Skripsi]. Surabaya: Fakultas Kedokteran UNAIR Surabaya.
- List PH, Schmidt PC. 2000. *Phytopharmaceuticals Technology*, Alih bahasa: David Eilaby. Florida CRC Press.
- Majumder R, Dhara M, Adhikari L. 2015. Comparative study of leaves and steam methanolic extract on antioxidant and antimicrobial activity through quantitative evaluation of phytoconstituent. *International Journal of Engineering Technology, Management and Applied Sciences*, vol 3
- Majumder R, Dhara M, Adhikari L. 2017. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Olax psittacorum*. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, Siksha 'O' Anusandhan University, Bhubaneswar, Odisha. *Journal of Pharmaceutical Research Volume 16, Issue 2*,: 182
- Maulida R dan Guntarti,. 2015. Pengaruh ukuran partikel beras hitam (*Oryza sativa* L.) terhadap rendemen ekstrak dan kandungan total antosianin. *Pharmaciana*, Vol. 5, No. 1, 2015: 9-16
- Middleton JR, Fales WH, Luby CD, Oaks JL, Sanchez S, Kinyon JM, et al. 2005. Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals. *J Clin Microbiol*; 43:2916-2919.
- Mishra Rambhakta, Gandhamardan hill range, Orissa, India - A Treasure trove of medicinal plants. Indian Herbal Traditions
- Muhaimin AA, Siswanto HP, Tyasningsih W, Suryanie. 2013. Perbedaan warna koloni *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada media ekstrak daging sapi dan sari kacang hijau yang ditambah sitrat dan bromthymol blue. *Jurnal Veterinaria Medica* Vol 6, No. 1
- Mycek, Mary J. 2011. *Farmakologi edisi 2*. Alih Bahasa Anwar Agoes. Jakarta : Widya Medika
- Naik R, Borkar S D, Acharya R N, Nariya M. 2015. Evaluation of antipyretic activity of *Olax scandens* (roxb.) stem bark. Research & Reviews: *Journal of Pharmacology*, Volume 5, Issue 1
- Ngajow M., Abidjulu J dan Kam VS. 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang matoe (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Jurnal MIPA UNSRAT ONLINE* 2(2) 128-132

- Nur AM & Astawam M. 2011. Kapasitas antioksidan bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) dalam bentuk segar, simplisia dan keripik pada pelarut nonpolar, semipolar dan polar [Skripsi]. Bogor : Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor.
- Maulita Cut Nuria, C.M., Faizatun, A., Sumantri. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, Dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Mediagro* Vol 5. No 2, 2009: Hal 26 - 37
- Owk, Aniel Kumar dan Lagudu, Mutyala Naidu. 2016. Evaluation of antimicrobial activity and phytochemicals in *Olax scandens* roxb. roots. India : Department of Botany, Andhra University, Visakhapatnam, Apr-Jun 2016, 232-239
- Parubaki, Apriani Sulu. 2013. Senyawa flavonoid yang bersifat antibakteri dari akway. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Papua. *Chem. Prog.* Vol. 6, No.1.
- Paul MD. 2002. *A Biosynthetic approach pharmaceutichal sciences* (Vol. 471496). <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.01.005>
- Pavia D. 1995. *Introduction to organic laboratory techniques, a microscale approach second edition*. USA : Harcourt College Pub.
- Pelczar M & Chan E. 1986. *Dasar-dasar mikrobiologi 2*. Diterjemahkan Oleh Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL. Jakarta : UI Press
- Permatasari G, Besung INK. dan Mahatmi H. 2013. Daya hambat perasan daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. *Indonesia Medicus Veterinus* Vol. 2 No. 2 : 162 – 169
- Plant Resources of South East Asia. [http://uses.plantnet-project.org/en/Olax\\_psittacorum\\_\(PROSEA\)](http://uses.plantnet-project.org/en/Olax_psittacorum_(PROSEA)) [Diakses pada 20 Oktober 2017]
- Poedjiadi. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta : UI Press
- Prabhu N, Sangeetha M, Chinnaswamy P and Joseph PL. 2006. A Rapid method of evaluating microbial load in healt care industry and application of alcohol to reduce nosocomial infection. *Journal of the Academy of Hospital Administration*. Vol. 18, No. 1, P. 1-12
- Pramita FY. 2013. Formulasi sediaan gel antiseptik ekstrak metanol daun kesum (*Polygonum minus* Huds). [Skripsi] Universitas Tanjungpura, Pontianak
- Rachmawati F, Nuria MC dan Sumantri. 2011. Uji aktivitas antibakteri fraksi kloroform ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) serta identifikasi

senyawa aktifnya [Skripsi] Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Semarang.

- Radji M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC
- Rissa LV, Muhammad WP, Anita KH. 2017. Perbandingan total rendemen dan skrining antibakteri ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper Betle L.*) secara mikrodilusi. Semarang: *Journal of Science and Applicative Technology* Vol.I No.2
- Robinson, T (n.d). 2011. *Kandungan Senyawa Organik Tingkat Tinggi, Diterjemahkan Oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata*. Bandung : ITB Press
- Rosia MJ, Taufiqurrahma I, Edyson. 2017. Perbedaan total flavonoid antara metode maserasi dengan sokletasi pada ekstrak daun binjai (*Mangifera caesia*). *Jurnal Kedokteran Gigi*
- Rukmono P dan Zuraida R. 2013. Uji Kepekaan antibiotik terhadap *Pseudomonas aeruginosa* penyebab sepsis neonatorum. unit perinatologi, RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, *Sari Pediatri*, Vol. 14, No. 5
- Samuel. 2013. Pola resistensi antibiotik terhadap isolat bakteri aerob penyebab infeksi luka operasi di ruang rawat inap bagian bedah dan kebidanan RSUD dr.Abdul Moeloek Bandar Lampung. [Skripsi]. Lampung: Universitas Lampung.
- Sangi M., Runtuwene MRJ, Simbala HEI dan Makang VMA. 2008. Analisis fitokimia tumbuhan obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chem. Prog.* Vol. 1 No. 1: 47 – 53.
- Sarker SD, Latif Z, & Gray AI. 2006. *Natural Products Isolation edisi 2*. Totowa (New Jersey). Humana Press Inc.
- Setyowati, Widiastuti Agustin Eko dkk. 2014. Skrining fitokimia dan identifikasi komponen utama ekstrak metanol kulit durian (*Durio zibethinus* Murr.) varietas petruk. Surakarta : Universitas Sebelas Maret dalam Seminar Nasional Kimia & Pendidikan Kimia VI : 979363174-0
- Siswandono. 2008. *Kimia Medisinal ed 2*. Surabaya: Airlangga University Press
- Swamynathan B and Ramamoorthy D. 2011. Journal of research in biology flora of sacred groves and its ethno- botanical importance in cuddalore district of Tamil Nadu, India. *Journal of Research in biology*.
- Suriawiria U. 2005 . *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Tapas Sunar Sinarti.

- Tiwari P, Bimlesh K, Mandeep K, Gurpreet K, Harleen K. 2011. Phytochemical screening and extraction: A Review. *Internasional Pharmaceutical Science* Vol 1 Issue 1
- Veeramuthu Duraipandiyan, Muniappan Ayyanar, Savarimuthu Ignacimuthu. 2006. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1186/1472-6882-6-35.
- Verawati, Nofiandi D, Petmawati. 2017. Pengaruh metode ekstraksi terhadap kadar fenolat total dan aktivitas antioksidan daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). *Jurnal Katalisator* Vol 2 No. 2 2017. DOI : <http://doi.org/10.22216/jk.v2i2.1744>
- Wahyono H. 2007. Peran Mikrobiologi klinik pada penanganan penyakit infeksi. makalah pidato pengukuhan guru besar dalam ilmu mikrobiologi. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Warsa UC, Karsinah, Lucky HM, Suharto dan Mardiasuti HW. 1994. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : ECG
- Widjajanti V N. 1999. *Obat-Obatan*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Winangsih, Erma Prihastanti, Sarjana Parman.2013. Pengaruh metode pengeringan terhadap kualitas simplisia lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* L.). [Skripsi]. Universitas Diponegoro, Semarang,
- Yuwono. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran*. Palembang: Departemen Mikrobiologi Universitas Sriwijaya.
- Zuhud EAM., Winiati PR, Hanny WC, dan Pipi PS. 2001. Aktivitas antimikroba ekstrak kedawung (*Parkia roxburghii* G. Don) terhadap bakteri patogen.. *Jurnal Teknologi & Indusri Pangan*, Vol. XII (1).

**L  
A  
M  
P  
I  
R  
A  
N**

Lampiran 1. Determinasi tanaman Wangon (*Olex scandens* Roxb)

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS SEBELAS MARET  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
**LAB. PROGRAM STUDI BIOLOGI**

Jl. Ir. Sutami 36A Kentingan Surakarta 57126 Telp. (0271) 663375 Fax (0271) 663375  
http://www.biology.mipa.uns.ac.id, E-mail biologi @ mipa.uns.ac.id

Nomor : 211/UN27.9.6.4/Lab/2017  
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan  
Lampiran :-

Nama Pemesan : Riana Desi Wulandari  
NIM : 20144052A  
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

**HASIL DETERMINASI TUMBUHAN**

Nama Sampel : *Olex scandens* Roxb.  
Familia : Olacaceae

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-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59a-60b-64b-66a  
125. Olacaceae  
1b-4b 1. *Olex*  
1a *Olex scandens* Roxb.

**Deskripsi Tumbuhan :**

Habitus : perdu, menahun, tumbuh tegak atau merambat, tinggi 2-10 m. Akar : tunggang, bercabang, putih kotor atau putih kekuningan. Batang : bentuk bulat, berkayu, bercabang, permukaan cabang muda berambut halus, tetapi permukaan cabang tua permukaan gundul, cabang yang lebih tua kadangkala dilengkapi dengan alat tambahan berupa tanduk. Daun : tunggal, tersusun berseling; helaian anak daun berbentuk bulat telur-ellips memanjang, panjang 2-9.5 cm, lebar 0.75-3.5 cm, pangkal tumpul atau membulat atau tidak simetris, tepi rata, ujung runcing atau tumpul atau membulat, pertulangan menyirip, permukaan gundul, permukaan atas hijau tua, permukaan bawah hijau muda; tangkai daun bulat, panjang 0.5-0.75, hijau. Bunga : bunga majemuk berupa tandan, di ketiak daun, bunga tersusun dalam 2 baris, panjang tandan 0.5-3.5 cm, berambut pendek dan padat; panjang daun pelindung bunga 2 mm; panjang tangkai bunga 1-1.5 mm; kelopak bunga hijau; mahkota bunga 5-6, 3 diantaranya berwarna putih, panjang 7-9 mm, permukaan gundul; benangsari 3; benangsari mandul (staminodia) 5-6, bercabang 2, cabangnya kuning, sisanya putih; kepala putik bercuping 3, panjang tangkai putik 1.5-6 mm, bakal buah menumpang dan beruang 3. Buah : buah batu (drupa), bentuk ellipsoid, warna jingga, terdapat sisa kelopak bunga di bagian pangkal dan sisa tangkai putik di ujungnya. Biji : kecil, banyak.

Surakarta, 9 Oktober 2017

Kepala Lab. Program Studi Biologi

Dr. Tetri Widiyani, M.Si.  
NIP. 19711224 200003 2 001

Penanggungjawab  
Determinasi Tumbuhan

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

Mengetahui  
Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS

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

**Lampiran 2. Gambar daun Wangon dan serbuk daun wangon**



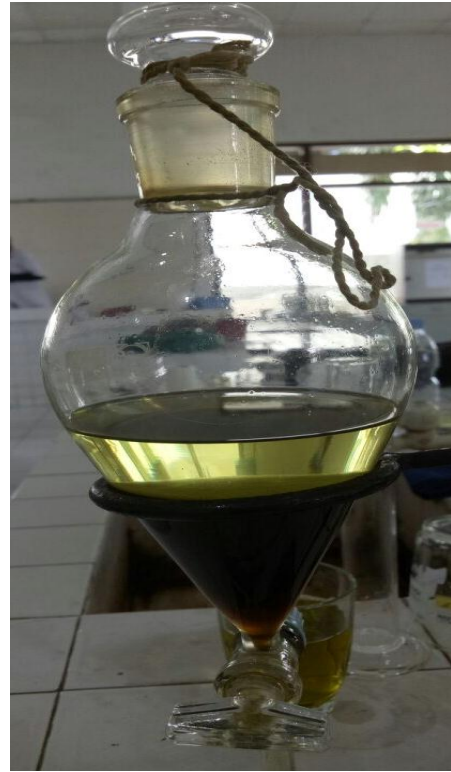
**Gambar daun wangon**



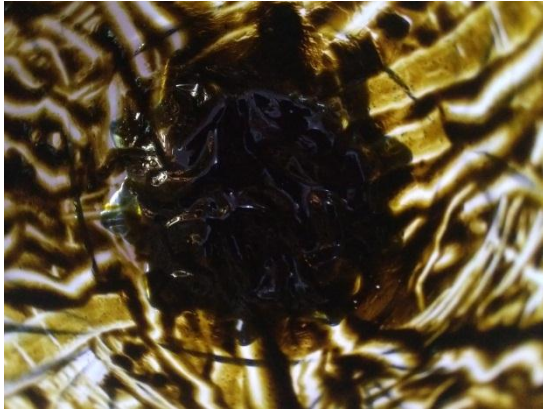
**Gambar serbuk daun wangon**



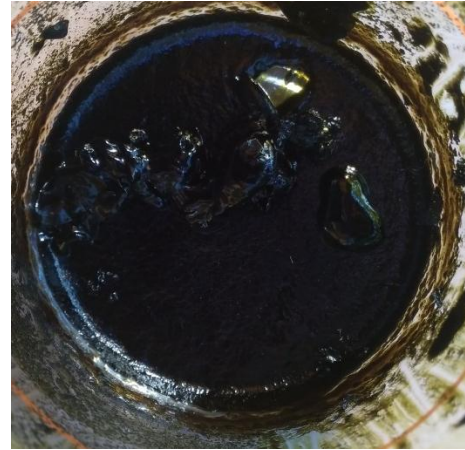
**Lampiran 3. Gambar Alat –alat****Alat Moisture balance****Alat oven****Alat ikubator****Alat autoclave****Alat Vortex****Alat Rotary evaporator**

**Lampiran 4. Gambar Alat Soxhletasi dan Corong Pisah****Gambar alat soxhlet****gambar alat fraksinasi****2 Sirkulasi****5 sirkulasi****7 sirkulasi****10 sirkulasi**

**Lampiran 5. Gambar ekstrak dan hasil Fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air**



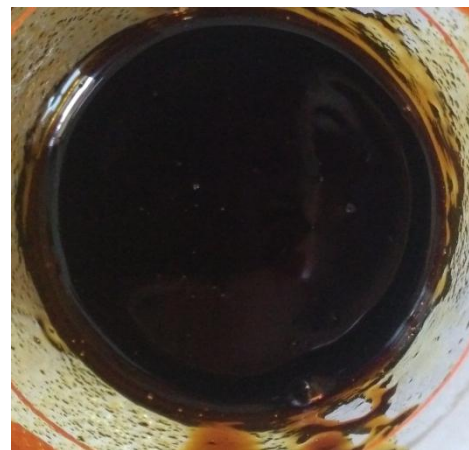
**Ekstrak etanol daun wangon**



**fraksi *n*-hexana**



**Fraksi etil asetat**




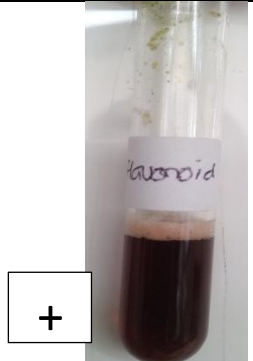

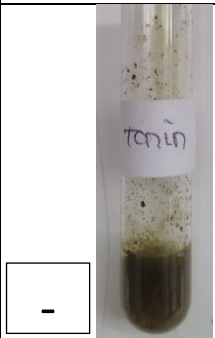
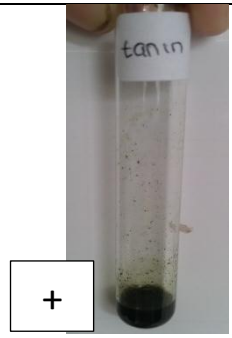
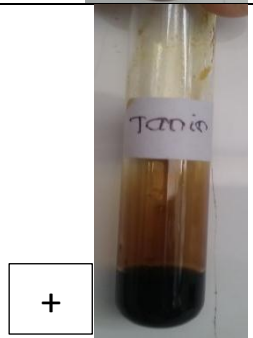
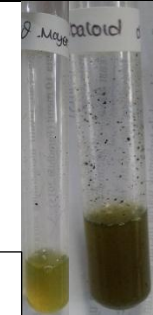
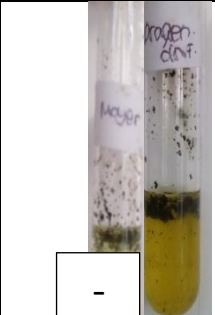
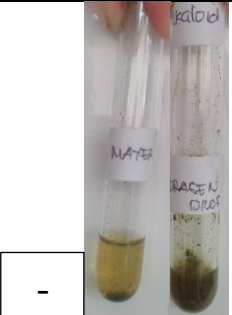
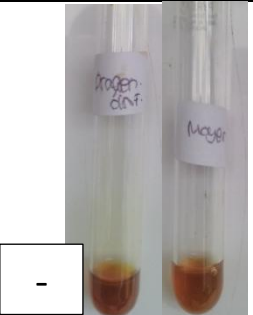


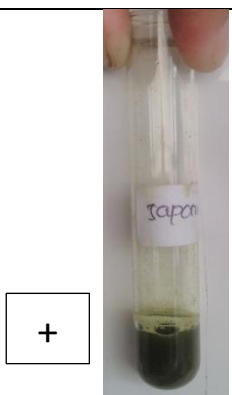
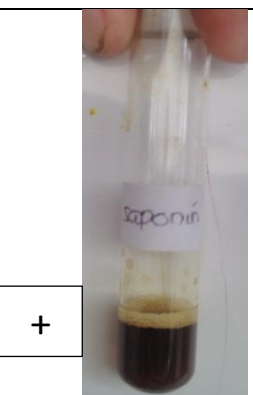









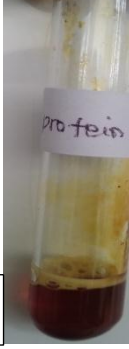

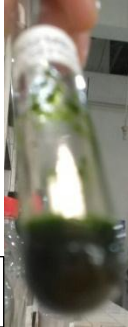

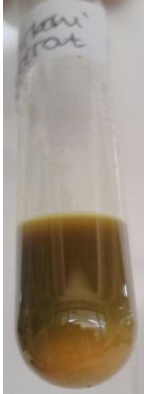



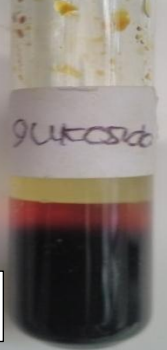
**fraksi air**



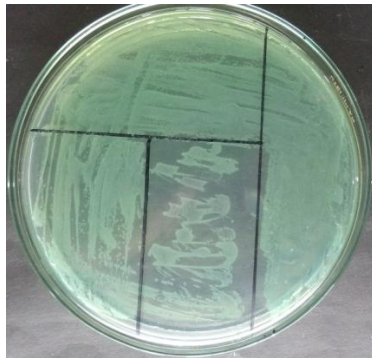
**Gambar ekstrak dan fraksi-fraksi setelah di encerkan dengan DMSO 1%**

Lampiran 6. Gambar hasil identifikasi ekstrak dan fraksi daun wangen

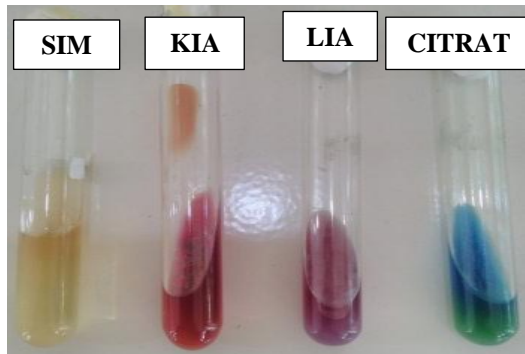
Senyawa	Bahan Uji			
	Ekstrak	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
Flavonoid	 +	 -	 +	 +
Tanin	 +	 -	 +	 +
Alkaloid	 -	 -	 -	 -
Saponin	 +	 +	 +	 +

Senyawa	Bahan Uji			
	Ekstrak	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
<b>Steroid</b>				
	+	+	+	-
<b>Protein</b>				
	-	-	-	-
<b>Karbohidrat</b>				
	+	-	+	+
<b>Glikosida</b>				
	+	+	+	+

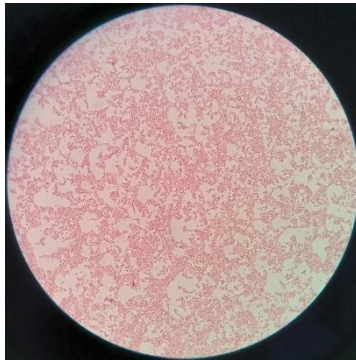
**Lampiran 7. Gambar hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa***



**Inokulasi bakteri**

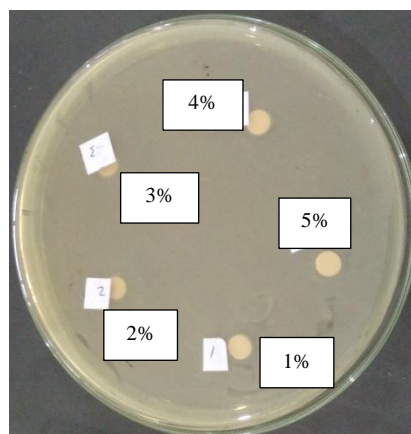


**Uji Biokimia**



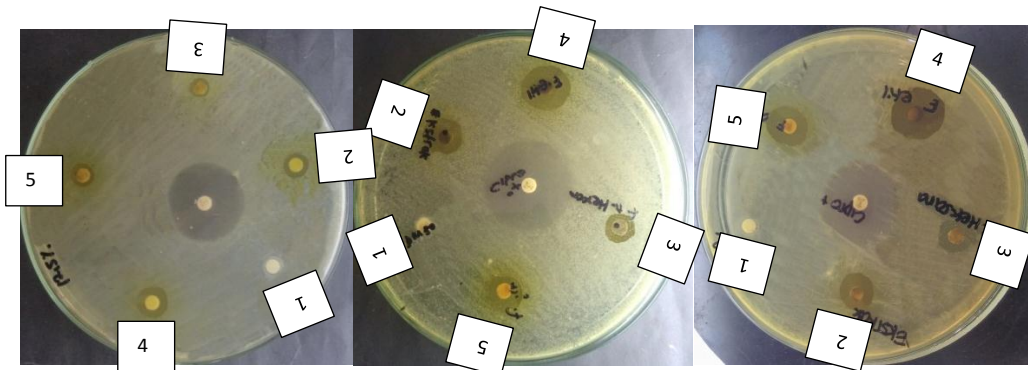
**Pengecatan Gram**

**Lampiran 8. Hasil uji aktivitas antibakteri pelarut DMSO berbagai konsentrasi**



**Lampiran 9. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun wangon dengan metode difusi**

**Replikasi 1**

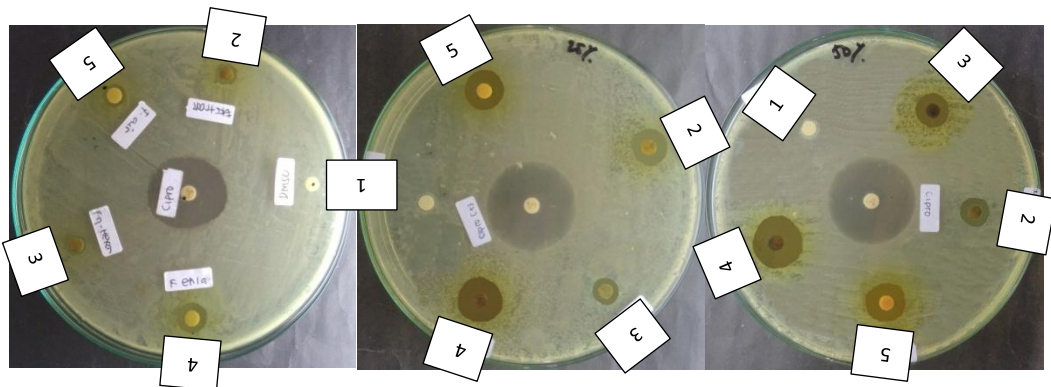


**konsentrasi 12,5%**

**konsentrasi 25%**

**konsentrasi 50%**

**Replikasi 2**

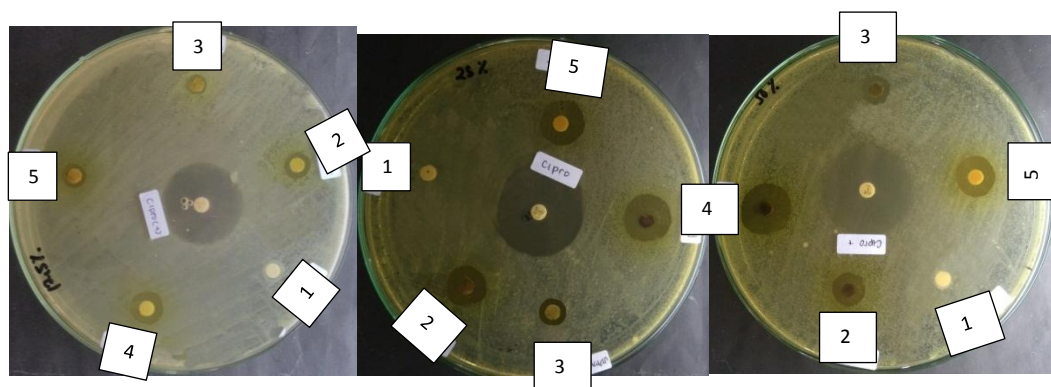


**konsentrasi 12,5%**

**konsentrasi 25%**

**konsentrasi 50%**

**Replikasi 3**



**konsentrasi 12,5%**

**konsentrasi 25%**

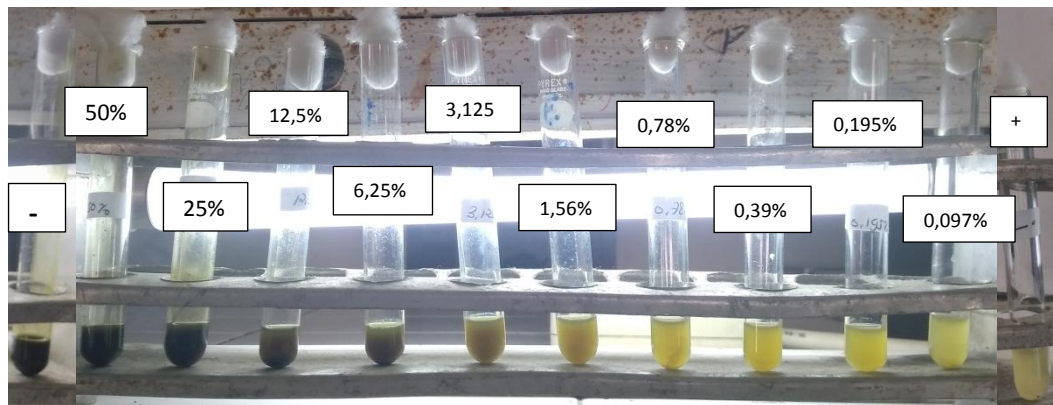
**konsentrasi 50%**

Keterangan lampiran 9:

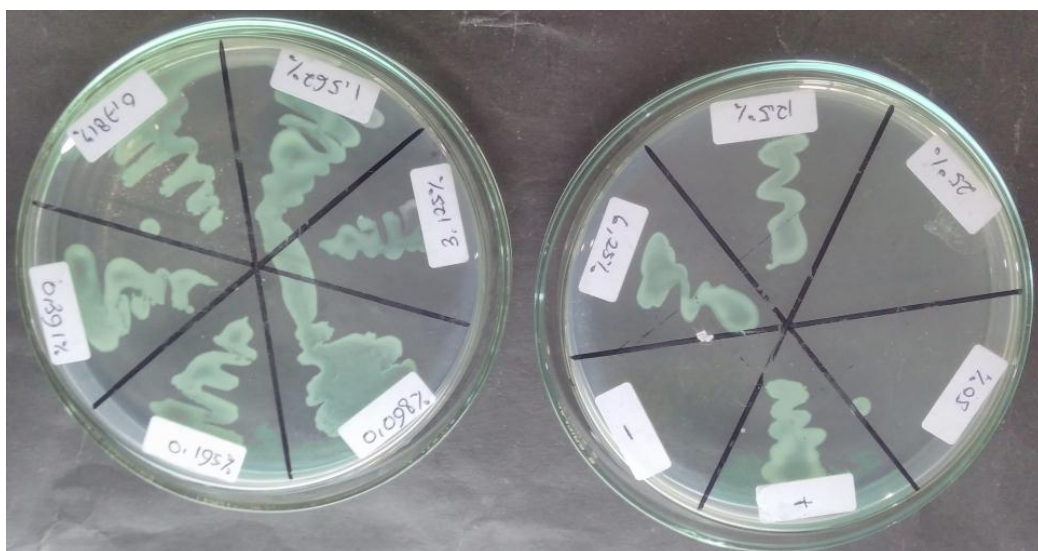
1. DMSO 1%
2. Ekstrak etanol 96%
3. Fraksi *n*-heksana
4. Fraksi etil asetat
5. Fraksi air

**Lampiran 10. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun wangon dengan metode dilusi**

**Replikasi 1**



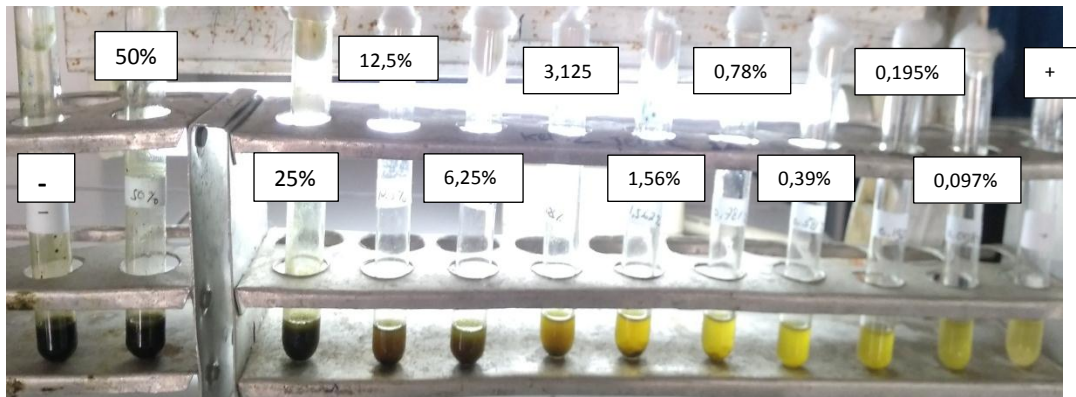
**Uji Dilusi fraksi teraktif daun wangon**



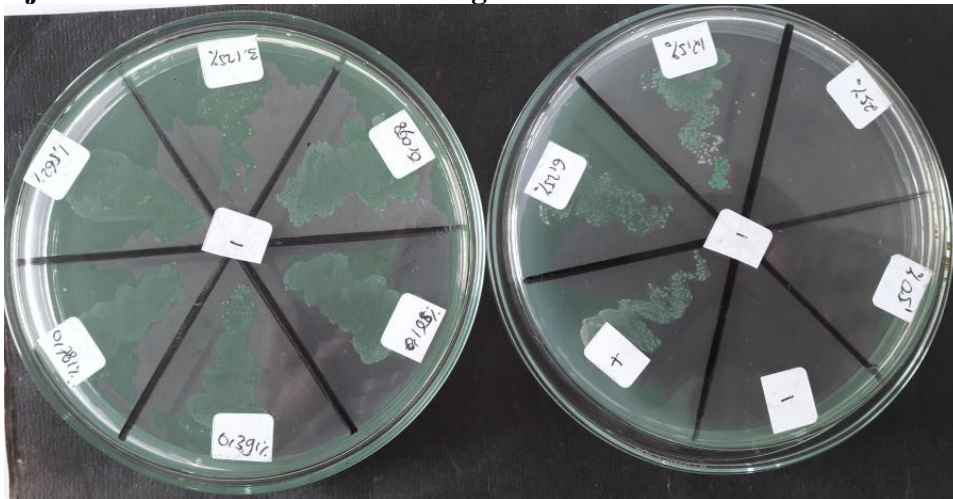
**Hasil inokulasi fraksi teraktif daun wangon**



## Replikasi 2

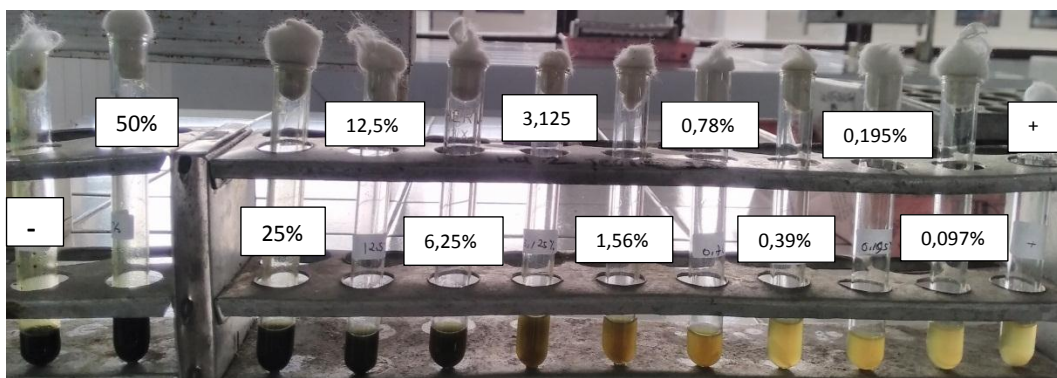


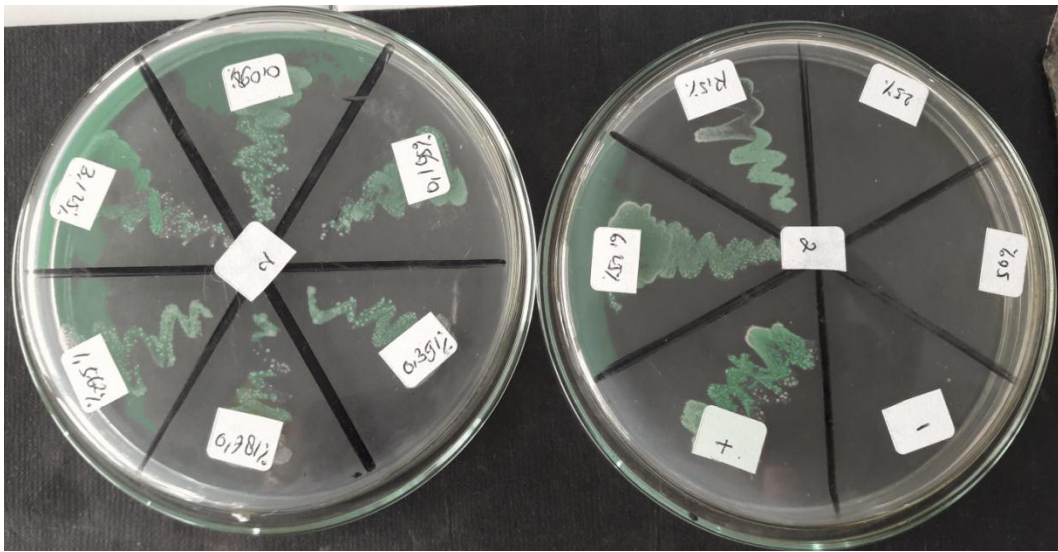
## Uji dilusi fraksi teraktif daun wangon



## Hasil inokulasi fraksi teraktif daun wangon

## Replikasi 3





**Lampiran 11. Perhitungan rendemen simplisia daun wangen**

<b>Berat basah (g)</b>	<b>Berat kering (g)</b>	<b>Rendemen (%) b/b</b>
<b>2,1 kg</b>	<b>1,2kg</b>	<b>57,14%</b>

Perhitungan rendemen

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

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{1,2}{2,1} \times 100\% = 57,14\%$$

**Lampiran 12. Perhitungan rendemen berat serbuk terhadap berat daun kering**

<b>Berat kering (g)</b>	<b>Berat serbuk (g)</b>	<b>Rendemen (%) b/b</b>
<b>1,2</b>	<b>1,15</b>	<b>95,83 %</b>

Perhitungan rendemen serbuk

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

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{1,2}{1,15} \times 100\% = 95,83\%$$

**Lampiran 13. Perhitungan rendemen ekstrak dan fraksi daun wangen****Rendemen ekstrak etanol daun wangen**

<b>Serbuk (g)</b>	<b>Ekstrak kental (g)</b>	<b>Rendemen (%)</b>
<b>350,0014</b>	<b>47,7991</b>	<b>13,6568 %</b>

Perhitungan rendemen ekstrak etanol

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

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{47,7991}{350,0014} \times 100\% = 13,6568 \%$$

### Rendemen fraksinasi daun wangon

Pelarut	Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
<i>n</i> -heksana	33,1055	2,9164	8,809
Etil asetat	33,1055	5,5942	16,898
Air	33,1055	18,7553	56,653

Perhitungan rendemen fraksi yang dilakukan sebanyak 6x :

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

#### Fraksi *n*-heksana

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{2,9164}{33,1055} \times 100\% = 8,809 \%$$

#### Fraksi etil asetat

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{5,5942}{33,1055} \times 100\% = 16,898 \%$$

#### Fraksi air

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{18,7553}{33,1055} \times 100\% = 56,653 \%$$

### Lampiran 14. Perhitungan dan pembuatan larutan stok ekstrak etanol dan fraksi daun wangon

#### Pembuatan larutan stok difusi konsentrasi 50%

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 50\% } b/v &= 50 \text{ g} / 100 \text{ mL} \\ &= 1,5 \text{ g} / 3 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 25\% } b/v : \quad V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 50 \% &= 2 \text{ mL} \cdot 25 \% \\ V_1 &= 1 \text{ mL} \end{aligned}$$

Memipet 1 mL larutan induk konsentrasi 50% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 1% ad 2 mL.

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi } 12,5\% \text{ } b/v : V_1.C_1 &= V_2.C_2 \\ V_1. 25\% &= 2 \text{ mL} . 12,5\% \\ V_1 &= 1 \text{ mL} \end{aligned}$$

Memipet 1 ml dari larutan induk konsentrasi 25% dimasukkan lam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 1% ad 2 ml

### **Pembuatan larutan stok dilusi konsentrasi 50% dari fraksi teraktif**

$$\text{Larutan stok } 50\% = \% \text{ } b/v = 1 \text{ g} / 2 \text{ ml}$$

$$\text{Konsentrasi } 50\% = 1 \text{ mL}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi } 25\% &= V_1.C_1 = V_2.C_2 \\ 0,5 \text{ mL} . 50\% &= 1 \text{ mL} . C_2 \\ C_2 &= 25\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi } 12,5\% &= V_1.C_1 = V_2.C_2 \\ 0,5 . 25\% &= 1 \text{ mL} . C_2 \\ C_2 &= 12,5\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi } 6,25\% &= V_1.C_1 = V_2.C_2 \\ 0,5 \text{ mL} . 12,5\% &= 1 \text{ mL} . C_2 \\ C_2 &= 6,25\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi } 3,125\% &= V_1.C_1 = V_2.C_2 \\ 0,5 \text{ mL} . 6,25\% &= 1 \text{ mL} . C_2 \\ C_2 &= 3,125\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi } 1,563\% &= V_1.C_1 = V_2.C_2 \\ 0,5 \text{ mL} . 3,125\% &= 1 \text{ mL} . C_2 \\ C_2 &= 1,563\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi } 0,781\% &= V_1.C_1 = V_2.C_2 \\ 0,5 \text{ mL} . 1,563\% &= 1 \text{ mL} . C_2 \\ C_2 &= 0,781\% \end{aligned}$$

$$\text{Konsentrasi } 0,391\% = V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$0,5 \text{ mL} \cdot 0,781\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,391\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,195\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \text{ mL} \cdot 0,391\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,195\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,097\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \text{ mL} \cdot 0,195\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,097\%$$

Kontrol negatif (-) = 1 mL fraksi etil asetat

Kontrol positif (+) = 1 mL suspensi bakteri

#### Lampiran 15. Standart kekeruhan Mc Farland

Standar	Volume dalam ml		Number of Bacterian/ ml/(10 <sup>8</sup> ) represented
	1% BaCl <sub>2</sub>	1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
0,5	0,5	99,5	1,5
1	1,0	99,0	3
2	2,0	98,0	6
3	3,0	97,0	9
4	4,0	96,0	12
5	5,0	95,0	15
6	6,0	94,0	18
7	7,0	93,0	21
8	8,0	92,0	24
9	9,0	91,0	27
10	10,0	90,0	30

#### Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media

##### 1. Formulasi dan pembuatan *Brain Heart Infusion* (BHI)

Brain Heart, Infusion from (Solids)	8,0 gram
Peptic Digest of Animal Tissue	5,0 gram
Pancreatic Digest of Casein	16,0 gram
Sodium Chloride	5,0 gram
Glucose	2,0 gram
Disodium Hydrogen Phosphate	2,5 gram
Agar	13,5 gram

Aquadest	1000 mL
pH $7.4 \pm 0.2$	

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung pH 7,4.

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

Meat Infussion	2,0 gram
Bacto asam kasamino	17,5 gram
Kanji	1,5 gram
Agar	17,0 gram
Aquadest	1000 mL
pH $7.3 \pm 0.1$	

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung pH 7,4.

3. Formulasi dan pembuatan *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA)

Tryptone	10 gram
Gelatin peptone	16 gram
Potassium sulphate	10 gram
Magnesium chloride, anhydrous	1.4 gram
Agar	11 gram
pH ( at $25^{\circ}\text{C}$ )	$7,1 \pm 0.2$
aquadest	1000 mL

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung pH 7,4.

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

Pancreatic digest of casein	20,0 gram
Peptic digest of animal tissue	6,1 gram
Ferrous ammonium sulfate	0,2 gram

Sodium thiosulfate	0,2 gram
Agar	3,5 gram
Aquadest	1000 mL
pH 7.3±0.2	

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung pH 7,4.

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

Beef extract	3,0 gram
Yeast extract	3,0 gram
Peptic digest of animal tissue	15,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
Lactose	10,0 gram
Dextrose	1,0 gram
Ferrous sulphate	0,2 gram
Sodium thiosulphate	0,3 gram
Phenol red	0,024 gram
Agar	15,0 gram
Aquadest	1000 mL
pH 7,4±0.2	

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung pH 7,4.

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

Peptic digest of animal tissue	5,0 gram
Yeast extract	3,0 gram
Dextrose	1,0 gram
L-Lysine	10,0 gram
Ferric ammonium citrate	0,5 gram
Sodium thiosulphate	0,04 gram
Bromocresol purple	0,02 gram



Agar	15,0 gram
Aquadest	1000 mL
pH 6,7±0.2	

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung pH 7,4.

7. Formulasi dan pembuatan Citrat Agar

Magnesium sulphate	0,2 gram
Ammonium dihydrogen phosphate	1,0 gram
Dipotassium phosphate	1,0 gram
Sodium citrate	2,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
Bromothymol blue	0,08 gram
Agar	15,0 gram
Aquadest	1000 mL
pH 6.8±0.2	

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian di sterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung pH 7,4.