

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN
BINAHONG (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) DAN DAUN TALAS
(*Colocasia esculenta* [L.] Schott) TERHADAP
Escherichia coli ATCC 25922**



Oleh :

Risky Herdina Putri
20144074 A

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN
BINAHONG (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) DAN DAUN TALAS
(*Colocasia esculenta* [L.] Schott) TERHADAP
Escherichia coli ATCC 25922**

 **SKRIPSI**
*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
Derajat sarjana farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi Pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh :

**Risky Herdina Putri
20144074 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

Dengan judul :

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN
BINAHONG (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) DAN DAUN TALAS
(*Colocasia esculenta* [L.] Schott) TERHADAP
Escherichia coli ATCC 25922**

yang disusun oleh peserta program
Risky Herdina Putri
20144074 A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal: 8 Maret 2018



Dekan,

Mengetahui
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi

Prof. Dr. RA. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt

Pembimbing Utama

Iswandi, S.Si, M.Farm., Apt

Pembimbing Pendamping

Edy Prasetya, Drs., M.Si

Penguji:

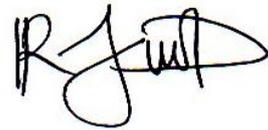
1. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt
2. Destik Wulandari, S.Pd.; M.Si
3. Hery Muhamad Ansory, S.Pd., M.Sc
4. Iswandi, S.Si, M.Farm., Apt

PERNYATAAN

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

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

Surakarta, 8 Maret 2018



Risky Herdina Putri

MOTTO DAN PERSEMBAHAN

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan”

(terjemahan Surah Al Insyirah ayat 5)

Skripsi ini saya persembahkan kepada :

- *Kedua orang tua, Adik, dan keluarga besar saya.*

*Terimakasih untuk doa dan dukungan serta cinta
luar biasa yang telah diberikan kepada saya.*

- *Agama, almamater, bangsa dan negara.*

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum Wr.Wb

Puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul “**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) DAN DAUN TALAS (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922**”. Penyusunan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi persyaratan untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Skripsi ini diharapkan dapat memberikan kontribusi bagi ilmu pengetahuan dalam bidang teknologi farmasi.

Penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak baik secara moril maupun materil, maka dengan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Allah SWT yang senantiasa memberikan rahmat dan hidayahNya kepada saya
2. Dr. Djoni Tarigan, MBA. selaku Rektor Universitas Setia Budi
3. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
4. Iswandi, M.Farm., Apt. selaku Pembimbing Utama dan Edy Prasetya, Drs., M.Si. selaku Pembimbing Pendamping yang telah banyak memberikan ilmu, masukan, pengarahan, dan bimbingan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Tim penguji skripsi yang telah memberikan masukan, kritik, dan saran demi kesempurnaan skripsi ini.
6. Seluruh Dosen, Asisten Dosen, Karyawan, dan Staf Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah banyak membantu demi kelancaran skripsi ini.
7. Kedua orang tua, adik, dan seluruh keluarga besar saya yang telah memberikan cinta, doa, dan dukungan serta semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.

8. Teman-teman baik di kampus maupun di tempat tinggal, atas bantuan dan dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan. Penulis mengharap segala kritik dan saran dari pembaca untuk menyempurnakan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapa saja yang membacanya.

Wassalamualaikum Wr.Wb

Surakarta, 8 Maret 2018

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|----------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| PENGESAHAN SKRIPSI | ii |
| PERNYATAAN | iii |
| MOTTO DAN PERSEMBAHAN | iv |
| KATA PENGANTAR..... | v |
| DAFTAR ISI | vii |
| DAFTAR GAMBAR | xi |
| DAFTAR TABEL | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiii |
| INTISARI..... | xv |
| ABSTRACT | xvi |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| A. Latar Belakang Masalah | 1 |
| B. Rumusan Masalah | 4 |
| C. Tujuan Penelitian..... | 4 |
| D. Kegunaan Penelitian..... | 4 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 6 |
| A. Tanaman Binahong (<i>Anredera cordifolia</i> [Ten.] Steenis)..... | 6 |
| 1. Sistematika Tanaman | 6 |
| 2. Nama lain | 7 |
| 3. Morfologi Tanaman | 7 |
| 4. Kandungan Kimia | 7 |
| 5. Kegunaan untuk pengobatan..... | 7 |
| B. Tanaman Talas (<i>Colocasia esculenta</i> [L.] Schott) | 8 |
| 1. Sistematika Tanaman | 8 |
| 2. Nama Lain..... | 8 |
| 3. Morfologi Tanaman | 9 |
| 4. Kandungan Kimia | 9 |
| 5. Kegunaan untuk pengobatan..... | 9 |
| C. Ekstraksi Simplisia..... | 9 |
| 1. Simplisia | 9 |

| | | |
|---------------------------------|---|----|
| 2. | Ekstrak..... | 10 |
| 3. | Ekstraksi | 10 |
| 4. | Metode Ekstraksi Dengan Menggunakan Pelarut | 10 |
| 4.1 | Cara dingin..... | 10 |
| 4.2 | Cara panas..... | 11 |
| 5. | Larutan Penyari atau Cairan Pelarut..... | 12 |
| D. | Senyawa Kimia | 12 |
| 1. | Flavonoid | 12 |
| 2. | Saponin | 13 |
| 3. | Tanin | 13 |
| 4. | Minyak Atsiri | 14 |
| 5. | Polifenol..... | 14 |
| 6. | Terpenoid | 14 |
| 7. | Alkaloid | 14 |
| E. | Bakteri <i>Escherichia coli</i> | 15 |
| 1. | Bakteri | 15 |
| 2. | Pertumbuhan bakteri..... | 15 |
| 3. | Bakteri <i>Escherichia coli</i> | 15 |
| F. | Mekanisme Antibiotik Terhadap Mikroorganisme | 19 |
| 1. | Antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel | 19 |
| 2. | Antibiotik yang merusak membrane plasma | 19 |
| 3. | Antibiotik yang menghambat sintesis protein | 20 |
| 4. | Antibiotik yang menghambat sintesis asam nukleat (DNA/RNA)..... | 21 |
| 5. | Antibiotik yang menghambat sintesis metabolit esensial..... | 21 |
| G. | Media..... | 21 |
| 1. | Definisi media | 21 |
| 2. | Jenis-jenis media pertumbuhan bakteri | 22 |
| H. | Sterilisasi | 23 |
| I. | Uji aktivitas antibakteri | 23 |
| 1. | Metode dilusi | 23 |
| 2. | Metode difusi | 25 |
| 3. | Metode Bioautografi..... | 26 |
| J. | Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum | 27 |
| 1. | Konsentrasi Hambat Minimum..... | 27 |
| 2. | Konsentrasi Bunuh Minimum..... | 28 |
| K. | Efek Kombinasi Obat | 28 |
| 1. | Sinergisme | 28 |
| 2. | Antagonis..... | 29 |
| L. | Diare | 29 |
| M. | Landasan Teori..... | 30 |
| N. | Hipotesis | 31 |
| BAB III METODE PENELITIAN | | 33 |
| A. | Populasi dan Sampel | 33 |

| | | |
|-----------------------------------|---|----|
| B. | Variable Penelitian | 33 |
| 1. | Identifikasi variabel utama | 33 |
| 2. | Klasifikasi variabel utama | 33 |
| 3. | Definisi operasional variabel utama | 34 |
| C. | Bahan dan Alat | 36 |
| 1. | Bahan | 36 |
| 2. | Alat | 36 |
| D. | Jalannya Penelitian..... | 36 |
| 1. | Determinasi dan identifikasi tanaman daun binahong dan daun talas | 36 |
| 2. | Pengambilan dan pengumpulan bahan | 37 |
| 3. | Pembuatan serbuk simplisia..... | 37 |
| 4. | Penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dan daun talas | 37 |
| 5. | Pembuatan ekstrak..... | 37 |
| 6. | Uji bebas etanol ekstrak daun binahong dan daun talas | 39 |
| 7. | Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun binahong dan daun talas | 39 |
| 8. | Sterilisasi Alat | 40 |
| 9. | Identifikasi Bakteri Uji | 40 |
| 10. | Pembuatan suspensi bakteri uji <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 42 |
| 11. | Pengujian Aktivitas Antibakteri | 42 |
| E. | Analisa Hasil..... | 43 |
| F. | Skema Penelitian..... | 44 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | | 46 |
| A. | Hasil Penelitian | 46 |
| 1. | Identifikasi tanaman daun binahong dan daun talas..... | 46 |
| 2. | Hasil pembuatan serbuk daun binahong dan daun talas..... | 46 |
| 3. | Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dan daun talas..... | 47 |
| 4. | Hasil pembuatan ekstrak etanol daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan perbandingan 1:1, 1:3, dan 3:1. | 48 |
| 5. | Hasil uji bebas etanol daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan perbandingan 1:1, 1:3, dan 3:1 | 48 |
| 6. | Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun binahong dan daun talas | 49 |
| 7. | Hasil identifikasi bakteri uji..... | 50 |
| 8. | Hasil pembuatan suspensi bakteri uji <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 53 |
| 9. | Hasil uji pendahuluan aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> [Ten.] Steenis) dan daun talas (<i>Colocasia esculenta</i> [L.] Schott) serta kombinasi | |

| | | |
|-------|--|----|
| | keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, atau 3:1, terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara difusi..... | 53 |
| 10. | Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> [Ten.] Steenis) dan daun talas (<i>Colocasia esculenta</i> [L.] Schott) serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 3:1 terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara dilusi | 58 |
| BAB V | KESIMPULAN DAN SARAN | 62 |
| | A. Kesimpulan..... | 62 |
| | B. Saran..... | 62 |
| | DAFTAR PUSTAKA..... | 63 |
| | LAMPIRAN | 70 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|---|---------|
| Gambar 1. Tanaman binahong (<i>Anredera cordifolia</i> [Ten.] Steenis)..... | 6 |
| Gambar 2. Tanaman Talas (<i>Colocasia esculenta</i> [L.] Schott)..... | 8 |
| Gambar 3. Skema proses pembuatan ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi 1:1, 1:3, dan 3:1 | 44 |
| Gambar 4. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 45 |
| Gambar 5. Hasil identifikasi koloni <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 pada media <i>Endo Agar</i> | 50 |
| Gambar 6. Hasil identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram..... | 51 |
| Gambar 7. Diagram batang hasil uji aktivitas antibakteri daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi 1:1, 1:3, dan 3:1 terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara difusi | 56 |
| Gambar 8. Struktur Auron | 60 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|---------|
| Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah..... | 46 |
| Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong menggunakan alat <i>moisture balance</i> | 47 |
| Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun talas menggunakan alat <i>moisture balance</i> | 47 |
| Tabel 4. Rendemen ekstrak etanol daun binahong dan daun talas..... | 48 |
| Tabel 5. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya..... | 48 |
| Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun binahong dan daun talas..... | 49 |
| Tabel 7. Hasil identifikasi biokimia pada bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922..... | 51 |
| Tabel 8. Hasil uji pendahuluan aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, atau 3:1, terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara difusi | 54 |
| Tabel 9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 3:1 terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara dilusi..... | 59 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|---|---------|
| Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> [Ten.] Steenis) | 71 |
| Lampiran 2. Hasil determinasi tanaman daun talas (<i>Colocasia esculenta</i> [L.] Schott)..... | 72 |
| Lampiran 3. Foto tanaman, daun, serbuk, dan ekstrak daun binahong dan daun talas | 73 |
| Lampiran 4. Foto botol maserasi, <i>Rotary evaporator</i> , <i>Moisture balance</i> , <i>Oven</i> , <i>Incubator</i> , <i>Autoclave</i> | 74 |
| Lampiran 5. Foto Identifikasi kandungan ekstrak daun binahong dan daun talas | 75 |
| Lampiran 6. Foto hasil identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 77 |
| Lampiran 7. Foto hasil uji pendahuluan aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:3 terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara difusi | 78 |
| Lampiran 8. Foto hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak uji terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara dilusi | 79 |
| Lampiran 9. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basa daun binahong dan daun talas..... | 85 |
| Lampiran 10. Perhitungan penetapan susut pengeringan menggunakan alat <i>moisture balance</i> | 86 |
| Lampiran 11. Perhitungan pembuatan ekstrak kombinasi serbuk daun binahong dan daun talas dengan perbandingan 1:1, 1:3, dan 3:1. | 87 |
| Lampiran 12. Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun binahong dan daun talas | 88 |
| Lampiran 13. Komposisi dan pembuatan media | 89 |
| Lampiran 14. Standard kekeruhan <i>Mc.Farland</i> | 92 |
| Lampiran 15. Perhitungan konsentrasi uji dilusi..... | 93 |
| Lampiran 16. Hasil analisis statistik diameter daerah hambat dari ekstrak | |

| | |
|---|-----|
| daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi 1:1, 1:3: dan 3:1 terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922..... | 94 |
| Lampiran 17. Hasil analisis statistik konsentrasi dari ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi 3:1 terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 98 |
| Lampiran 18. Penjelasan hasil identifikasi senyawa flavonoid, saponin, tanin, alkaloid, dan terpenoid..... | 100 |

INTISARI

PUTRI, R.H., 2018. UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) DAN DAUN TALAS (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI SURAKARTA

Daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) mengandung flavonoid, saponin, tanin, alkaloid, dan terpenoid yang diduga memiliki aktivitas antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui manakah dari ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ekstraksi daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Hasil ekstraksi dilakukan uji pendahuluan dengan metode difusi untuk mengetahui aktivitas antibakteri yang paling efektif dari kombinasi 1:1, 1:3, dan 3:1. Konsentrasi yang digunakan untuk uji difusi adalah 50%. Hasil uji difusi yang paling efektif dilanjutkan uji dilusi untuk menentukan nilai KBM dengan konsentrasi 33,33%; 16,66%; 8,33%; 4,16%; 2,08%; 1,04%; 0,52%; 0,26%; 0,13%; 0,06%, terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Hasil penelitian pada uji difusi masing-masing ekstrak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Aktivitas paling efektif ditunjukkan pada kombinasi ekstrak daun binahong dan daun talas dengan perbandingan 3:1 dengan diameter daerah hambat 25,75 mm. Hasil uji dilusi nilai KBM dari ekstrak daun binahong, daun talas, dan kombinasi 3:1 berturut-turut adalah 4,16%, 16,66%, dan 2,08%.

Kata kunci: antibakteri, daun binahong, daun talas, *Escherichia coli* ATCC 25922.

ABSTRACT

PUTRI, R.H., 2018. ANTIBACTERIALS ACTIVITIES TEST OF COMBINATION THE ETHANOL EXTRACT OF BINAHONG LEAVES (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) AND TARO LEAVES (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) TO *Escherichia coli* ATCC 25922, SKRIPSI, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA

Binahong leaves (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) and taro leaves (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) has containing flavonoids, saponins, tannins, alkaloids, and terpenoids that are suspected of having antibacterial activity. The purpose of this study was to determine which of the extracts of binahong leaves and taro leaves and combination of both has the most effective antibacterial activity to inhibit the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922.

Extraction of binahong leaves and taro leaves and combination of both used maceration methods with 96% ethanol. The extraction results were carried out by a preliminary test with a diffusion method to find out the most effective antibacterial activity a combination of 1:1, 1:3 and 3:1. The concentration used for the diffusion test is 50%. Results of test the most effective diffusion continued dilution test to determine the value of the MBC with a concentration of 33,33%; 16,66%; 8,33%; 4,16%; 2,08%; 1,04%; 0,52%; 0,26%; 0,13%; 0,06%, against *Escherichia coli* ATCC 25 922.

Results of the research on diffusion test of each extract has an antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922. The most effective activity was shown on the combination of the extract of binahong leaves and taro leaves with a ratio of 3:1 with the inhibition area diameter 25,75 mm. The value result of dilution test of MBC from binahong leaves extract, taro leaves, and combination of 3:1 were 4,16%, 16,66%, and 2,08%.

Keywords: antibacterial, binahong leaves, taro leaves, *Escherichia coli* ATCC 25922.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Diare merupakan penyakit endemis di Indonesia dan salah satu penyakit potensial kejadian luar biasa (KLB) yang sering disertai dengan kematian. Pada tahun 2015 terjadi 18 kali KLB diare yang tersebar di 11 provinsi, 18 kabupaten/kota, dengan jumlah penderita 1.213 orang dan kematian 30 orang (Kemenkes RI 2016). Diare adalah buang air besar dengan tinja berbentuk cair atau setengah cair (setengah padat), kandungan air tinja lebih banyak dari biasanya. Frekuensi buang air besar encer lebih dari 3 kali perhari. Buang air besar encer tersebut dengan atau tanpa disertai lendir dan darah. Infeksi bakteri adalah penyebab diare yang paling sering terjadi. Beberapa bakteri berikut ini dapat menyebabkan terjadinya diare yaitu, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perferingens*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterolitica*, *Klebsiella pnemoniae*, *Vibrio haemolyticus* (Sudoyo *et al.* 2009).

Salah satu penyebab penyakit diare adalah infeksi bakteri *Escherichia coli*. *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang, bersifat anaerob fakultatif (Jawetz *et al.* 2007). Terdapat beberapa galur *Escherichia coli* yang patogen dan tidak patogen. *Escherichia coli* yang tidak patogen dalam jumlah normal ditemukan di dalam usus besar manusia, berperan dalam pencernaan makanan dengan menghasilkan vitamin K dari bahan yang belum dicerna dalam usus besar. *Escherichia coli* yang patogen dapat menyebabkan kasus diare berat pada semua kelompok usia melalui endotoksin yang dihasilkannya (Badan Standardisasi Nasional 2009). *Escherichia coli* dapat menyebar dengan cara kontak langsung kemudian diteruskan melalui mulut atau dengan pemindahan pasif melalui makanan atau minuman (Melliawati 2009).

Alternatif pengobatan untuk diare salah satunya adalah dengan menggunakan tanaman obat. Tanaman obat yang mulai dimanfaatkan oleh masyarakat untuk pengobatan berbagai penyakit salah satunya adalah daun

binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis). Menurut penelitian Sari (2011) daun binahong memiliki kandungan kimia yang diketahui mempunyai sifat sebagai antibakteri antara lain saponin, flavonoid, dan minyak atsiri. Ekstrak etanol daun Binahong memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*. KHM kualitatif ekstrak etanol daun binahong terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro* adalah 3,9 mg/ml. KHM kuantitatif ekstrak etanol daun binahong terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro* adalah 2,1208 mg/ml.

Tanaman lain yang dapat digunakan sebagai pengobatan untuk diare adalah tanaman talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott). Tanaman talas merupakan tanaman berupa herba yang termasuk suku talas-talasan. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Arisandi (2016) daun talas memiliki kandungan yaitu flavonoid, saponin, terpen, tanin, dan alkaloid yang memiliki khasiat sebagai antibakteri. Ekstrak etanol 96% dari daun talas menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dengan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah 20% b/v.

Produk alami dari tanaman obat sudah sejak lama digunakan untuk pengembangan obat baru untuk mengobati berbagai infeksi. Beberapa studi telah mengusulkan strategi baru yaitu kombinasi produk tanaman alam dan antibiotik untuk terapi infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Produk tanaman alam tersebut bisa berpotensi meningkatkan aktivitas antibiotik (Jayaraman *et al.* 2010). Kombinasi dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas yang dihasilkan pada keduanya ketika dikombinasi. Hasil dari kombinasi bisa bersifat sinergis atau antagonis, hasil dikatakan sinergis apabila hasil kombinasi memiliki efek terapeutik yang lebih besar dibandingkan dengan penggunaan tunggal, sebaliknya hasil dikatakan antagonis apabila hasil kombinasi memiliki efek terapeutik yang lebih kecil atau saling meniadakan antara antibakteri yang digunakan (Ayu 2013).

Tanaman daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schoott) masing-masing memiliki kandungan kimia yang berguna sebagai antibakteri. Flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak permeabilitas dinding sel bakteri (Kurniawan dan Aryana 2015). Saponin dapat menekan pertumbuhan bakteri,

karena senyawa tersebut dapat menurunkan tegangan permukaan dinding sel dan apabila berinteraksi dengan dinding sel bakteri maka dinding sel tersebut akan lisis (Karlina *et al.* 2013). Tanin dapat merusak membran sel, mengerutkan dinding sel, sehingga menyebabkan terganggunya permeabilitas sel yang dapat mengarah pada kematian. Selain itu, tanin juga memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menginaktivasi enzim (Prasetyo 2015). Alkaloid dapat mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Yunikawati *et al.* 2013). Senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan dengan mengganggu proses terbentuknya dinding sel, sehingga dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Kurniawan dan Aryana 2015).

Penelitian kombinasi dua ekstrak pernah dilakukan oleh Fitriantari (2017) yaitu kombinasi ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) dan daun lidah buaya (*Aloe barbadensis* Miller) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Penelitian tersebut mendapatkan hasil yang baik, bahwa terdapat peningkatan potensi antibakteri daun binahong dan daun lidah buaya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan kombinasi ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) dan uji aktivitasnya terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Keuntungan ekstraksi dengan cara maserasi adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana. Proses maserasi dilakukan menggunakan pelarut etanol 96%. Etanol digunakan sebagai pelarut karena lebih selektif, tidak beracun, kuman sulit tumbuh, dapat bercampur dengan air dalam berbagai perbandingan serta memiliki titik didih rendah yaitu 78.4°C (Wulandari 2011). Kombinasi dibuat dengan beberapa variasi perbandingan antara kedua ekstrak yang dikombinasikan untuk mengetahui variasi mana yang memiliki aktivitas anti bakteri paling efektif. Pengujian dilakukan dengan metode dilusi untuk mengetahui seberapa banyak jumlah zat antimikroba yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan dan membunuh bakteri yang diuji (Jawetz *et al.* 2007).

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Manakah dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, dan 3:1, yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922?
2. Berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, atau 3:1, terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui manakah dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, dan 3:1, yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.
2. Untuk mengetahui berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, atau 3:1, terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

D. Kegunaan Penelitian

Memberikan informasi mengenai aktivitas antibakteri dari kombinasi ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas

(*Colocasia esculenta* [L.] Schott) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Dapat digunakan sebagai penelitian pendahuluan untuk memanfaatkan kombinasi ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) sebagai salah satu alternatif antibakteri terhadap *Escherichia coli*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

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

1. Sistematika Tanaman

Sistematika Tanaman Binahong menurut (Pink 2004) sebagai berikut.

- Kingdom : Spermatophyta
- Subkingdom : Tracheobionta (berpembuluh)
- Superdivisio : Spermatophyta (menghasilkan biji)
- Divisio : Magnoliophyta (berbunga)
- Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua/ dikotil)
- Sub kelas : Hamamelidae
- Ordo : Caryophyllales
- Familia : Basellaceae
- Genus : *Anredera*
- Spesies : *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis



Gambar 1. Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis)

2. Nama lain

Tanaman binahong memiliki nama lain yaitu *Boussingaultia gracilis* Miers, *Boussingaultia cordifolia*, *Boussingaultia baselloides* dan memiliki nama daerah yaitu Indonesia (binahong), Cina (teng sar chi), Inggris (madeira vine) (Pink 2008).

3. Morfologi Tanaman

Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) merupakan tanaman menjalar, berumur panjang, bisa mencapai panjang lebih dari 6 m. Batang lunak, silindris, saling membelit, berwarna merah, bagian dalam solid, permukaan halus, kadang membentuk semacam umbi yang melekat di ketiak daun dengan bentuk tak beraturan dan bertekstur kasar. Daun tunggal, bertangkai sangat pendek (subsesille), tersusun berseling, berwarna hijau, bentuk jantung (cordata), panjang 5-10 cm, lebar 3-7 cm, helaian daun tipis lemas, ujung runcing, pangkal berlekuk (emarginatus), tepi rata, permukaan licin, bisa dimakan. Bunga majemuk berbentuk tandan, bertangkai panjang, muncul di ketiak daun, mahkota berwarna krem keputih-putihan berjumlah lima helai tidak berlekatan, panjang helai mahkota 0,5-1 cm, berbau harum. Akar berbentuk rimpang, berdaging lunak (BPOM 2008).

4. Kandungan Kimia

Simplisia daun binahong mengandung senyawa aktif alkaloid, polifenol dan saponin (Hidayati 2009). Ekstrak daun binahong dapat menjadi antibakterial dengan kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, polifenol, saponin, alkaloid, terpenoid, minyak atsiri, dan tanin (Umar *et al.* 2012).

5. Kegunaan untuk pengobatan

Secara tradisional tanaman binahong dikenal oleh masyarakat untuk mengobati berbagai macam penyakit, di antaranya adalah penyakit infeksi (Amanda 2015). Daun dan batang binahong yang dilumatkan efektif menyembuhkan memar, rematik, pegal linu, nyeri urat dan menghaluskan kulit. Rebusan akar binahong dapat digunakan untuk mengeringkan luka bekas operasi. Rebusan umbi binahong digunakan untuk menyembuhkan luka, maag dan tifus. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak air dan kloroform akar (*Anredera*

cordifolia [Ten.] Steenis) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan Konsentrasi Hambat Minimumnya sebesar 60 mg/ml (Tshikalage *et al.* 2004).

B. Tanaman Talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott)

1. Sistematika Tanaman

Sistematika Tanaman Talas menurut (Koawara dan Sutrisno 2013) sebagai berikut.

| | |
|---------|--|
| Kingdom | : Plantae |
| Divisi | : Spermatophyta |
| Class | : Monocotyledoneae |
| Ordo | : Arecales |
| Famili | : Araceae |
| Genus | : <i>Colocasia</i> |
| Spesies | : <i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott |



Gambar 2. Tanaman Talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott)

2. Nama Lain

Nama lain talas yaitu taro (English), alavi, patarveliyya (Gujarati), arvi, kachalu (Hindi), alu (Marathi), alupam, alukam (Sanskrit), dan sempu (Tamil) (Prajapati dan Rakesh 2011). Old cocoyam, abalong, taioba, keladi, satoimo, tayoba, dan yutao (Koawara dan Sutrisno 2013).

3. Morfologi Tanaman

Tanaman talas merupakan daun lengkap karena memiliki helaian daun, tangkai daun dan pelepah. Daun tanaman ini juga termasuk daun tunggal dan memiliki daun yang berjumlah 2 sampai 5 helai. Tangkai daun talas lembut, berukuran panjang dan padat berisi serta mempunyai banyak rongga udara yang membuat tanaman beradaptasi pada kondisi tergenang. Tangkai daun ini berwarna hijau dan bergaris, helaian daun berukuran 6 sampai 60 cm dengan lebar 7 sampai 53 cm berbentuk bulat oval atau lonjong. Ujung helaian daun meruncing bagian bawahnya berkilin serta taju pangkalnya membulat. Daun talas berbentuk seperti perisai dan ibu tulang daunnya besar bisa dibedakan dengan anak tulang daun lainnya, tepi daunnya merata serta pertulangan daun menjari (Pratiwi K 2016).

4. Kandungan Kimia

Ekstrak etanol daun talas memiliki kandungan fenolik, antosianin, tanin, saponin, terpenoid, antraquinon, alkaloid, flavonoid, sterol, karbohidrat, vitamin A dan C (Goncalves *et al.* 2013). Ekstrak etanol daun talas mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid/ steroid (Khairany *et al.* 2015)

5. Kegunaan untuk pengobatan

Tanaman talas telah dikenal sejak zaman dahulu akan sifat pengobatannya dan telah dimanfaatkan sebagai pengobatan berbagai penyakit seperti asma, arthritis, diare, pendarahan internal, gangguan neurologis, dan gangguan kulit (Prajapati dan Rakesh 2011). Pemanfaatan daun talas dalam bidang medis secara empiris serta penelitian menunjukkan adanya antiinflamasi secara ilmiah (Biren *et al.* 2007). Sebagai antibiotik, talas juga dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba untuk menghalangi pertumbuhan beberapa bakteri hewan air seperti *Vibro cholera*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan lain-lain (Wei *et al.* 2011).

C. Ekstraksi Simplisia

1. Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain berupa bahan

yang telah dikeringkan. Simplisia berdasarkan sumbernya dapat dibedakan menjadi tiga yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, simplisia pelikan (DepKes RI 1995).

Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan (isi sel) yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau isi sel yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan adalah simplisia yang berupa bahan pelikan yang belum diolah dengan cara sederhana atau belum berupa zat kimia murni (DepKes RI 1995).

2. Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati maupun hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dengan massa atau serbuk yang tersisa diperlukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (BPOM RI 2005).

3. Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan pemisahan atau penarikan kandungan senyawa organik atau beberapa zat yang dapat larut dari suatu padatan atau cairan dengan bantuan pelarut cair. Simplisia yang diekstraksi mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (DepKes RI 2000).

4. Metode Ekstraksi Dengan Menggunakan Pelarut

Metode Ekstraksi Dengan Menggunakan Pelarut menurut DepKes RI (2000) yaitu :

4.1 Cara dingin.

4.1.1 Maserasi. Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia menggunakan

perendaman pelarut dengan pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Membran sel dari simplisia akan pecah sehingga senyawa aktif yang terdapat di dalam simplisia akan keluar karena adanya perbedaan tekanan yang ditimbulkan pada proses maserasi tersebut. Maserasi dilakukan dengan cara 10 bagian simplisia dengan derajat halus tertentu dimasukan dalam bejana, kemudian dituangi dengan 75 bagian cairan penyari (10:75), ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya. Setelah 5 hari diserkai dan ampas diperas. Keuntungan penyarian dengan maserasi adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana (DepKes RI 1986).

4.1.2 Perkolasi. Perkolasi merupakan proses ekstraksi simplisia dengan selalu menggunakan pelarut baru dan dilakukan umumnya pada temperatur ruangan. Dilakukan terus menerus sampai diperoleh ekstrak yang jumlahnya 1 sampai 5 kali bahan (DepKes RI 2000).

4.2 Cara panas.

4.2.1 Refluks. Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang reatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (DepKes RI 2000).

4.2.2 Sokletasi. Sokletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi berkesinambungan dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (DepKes RI 2000).

4.2.3 Digesti. Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan berkesinambungan) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C (DepKes RI 2000).

4.2.4 Infus. Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit) (DepKes RI 2000).

4.2.5 Dekok. Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ($\geq 30^\circ\text{C}$) dan temperatur sampai titik didih air (DepKes RI 2000).

5. Larutan Penyari atau Cairan Pelarut

Cairan pelarut adalah pelarut yang optimal untuk menyari senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, ekstraknya hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan karena senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya (DepKes RI 2000).

Larutan penyari yang baik harus memenuhi kriteria murah, mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki dan tidak mempengaruhi zat aktif. Dirjen POM Departemen Kesehatan Indonesia (1995) menetapkan cairan yang dapat digunakan penyari adalah air, etanol-air, dan eter. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan karena zat lain yang mengganggu proses pembuatan sari seperti gom, pati, protein, lemak, enzim, dan lendir akan ikut tersari. Air memiliki gaya ekspresi yang menonjol, bahan pengotor ikut terambil sehingga menyebabkan reaksi pemutusan secara hidrolitik dan fermentatif yang dapat mengakibatkan cepatnya perubahan bahan aktif. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antraknon, flavonoid, steroid, damar, dan klorofil (Hidayati 2009). Etanol digunakan sebagai pelarut karena lebih selektif, tidak beracun, kuman sulit tumbuh, dapat bercampur dengan air dalam berbagai perbandingan serta memiliki titik didih rendah, yaitu 78.4°C, sehingga hanya memerlukan panas yang sedikit pada proses pemekatan (Wulandari 2011).

D. Senyawa Kimia

1. Flavonoid

Flavanoid merupakan senyawa polar yang umumnya mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol, menthanol, butanol, dan aseton. Flavanoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol, senyawa fenol mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri, dan jamur. Senyawa flavanoid umumnya bersifat antioksidan dan banyak yang digunakan sebagai salah satu komponen bahan baku obat-obatan. Senyawa flavanoid dan turunannya

memiliki dua fungsi fisiologi tertentu, yaitu sebagai bahan kimia untuk mengatasi serangan penyakit (sebagai antibakteri) dan antivirus bagi tanaman. Mekanisme kerja dari flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak permeabilitas dinding sel bakteri (Kurniawan dan Aryana 2015). Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol yang mempunyai kecenderungan untuk mengikat protein, sehingga mengganggu proses metabolisme bakteri, selain itu flavonoid juga berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraselular yang mengganggu integritas membran sel bakteri. Flavonoid memiliki tiga mekanisme dalam memberikan efek antibakteri, antara lain dengan menghambat sintesis asam lemak, menghambat fungsi membran sitoplasma dan menghambat metabolisme energi (Ceshnie *et al.* 2005).

2. Saponin

Saponin merupakan senyawa aktif yang kuat dan menimbulkan busa bila dikocok (Kurniawan dan Aryana 2015). Saponin dapat menekan pertumbuhan bakteri, karena senyawa tersebut dapat menurunkan tegangan permukaan dinding sel dan apabila berinteraksi dengan dinding sel bakteri maka dinding sel tersebut akan lisis. Senyawa saponin akan mengganggu tegangan permukaan dinding sel, maka pada saat tegangan permukaan terganggu zat antibakteri masuk dengan mudah ke dalam sel dan akan mengganggu metabolisme hingga akhirnya terjadi kematian bakteri (Karlina *et al.* 2013).

3. Tanin

Tanin adalah senyawa turunan polifenol yang mampu merusak komponen dari protein pada bakteri. Tanin bersifat spasmolitik yaitu mengerutkan dinding sel atau membran sel yang telah lisis akibat dari senyawa saponin dan flavonoid sehingga menyebabkan senyawa tanin mampu masuk ke dalam sel bakteri dan mengkoagulasi protoplasma sel. Hal ini menyebabkan sel tidak bisa melakukan aktivitas hidup dan pertumbuhannya terhambat atau mati. Tanin dapat merusak membran sel, mengerutkan dinding sel, sehingga menyebabkan terganggunya permeabilitas sel yang dapat mengarah pada kematian. Selain itu, tanin juga memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menginaktivasi enzim (Prasetyo 2015).

4. Minyak Atsiri

Minyak atsiri juga berperan sebagai antibakteri dengan cara membantu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga tidak terbentuk. Hal ini bisa terjadi karena minyak atsiri memiliki gugus hidroksil yang berikatan yang berikatan melalui proses absorpsi melalui ikatan hydrogen (Kurniawan dan Aryana 2015).

5. Polifenol

Polifenol memiliki sifat sebagai antibakteri dengan mekanisme kerjanya dengan merusak membran sel bakteri, senyawa astrigennya dapat menginduksi pembentukan ikatan senyawa kompleks terhadap enzim atau substrat mikroba yang dapat menambah daya toksisitas (Akiyama *et al.* 2001).

6. Terpenoid

Terpenoid yang terkandung dalam tumbuhan biasanya digunakan sebagai senyawa aromatik yang menyebabkan bau pada eucalyptus, pemberi rasa pada kayu manis, cengkeh, jahe dan pemberi warna kuning pada bunga. Terpenoid tumbuhan mempunyai manfaat penting sebagai obat tradisional, anti bakteri, anti jamur dan gangguan kesehatan. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan dengan mengganggu proses terbentuknya membran dan atau dinding sel, sehingga membran atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Kurniawan dan Aryana 2015).

7. Alkaloid

Alkaloid memiliki fungsi yang bermacam-macam diantaranya sebagai racun untuk melindungi tanaman dari serangga dan binatang, sebagai hasil akhir dari reaksi detoksifikasi yang merupakan hasil metabolit akhir dari komponen yang membahayakan bagi tanaman, sebagai faktor pertumbuhan tanaman dan cadangan makanan. Alkaloid dapat mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Yunikawati *et al.* 2013).

E. Bakteri *Escherichia coli*

1. Bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme bersel satu dan berkembang biak dengan membelah diri (aseksual). Ukuran bakteri bervariasi baik penampang maupun penjangnya, tetapi pada umumnya penampang bakteri adalah sekitar 0,7-1,5 μm dan panjangnya sekitar 1-6 μm . Bakteri dibagi dalam golongan Gram positif dan Gram negatif berdasarkan reaksinya terhadap pewarnaan Gram. Perbedaan antara bakteri Gram positif dan Gram negatif, *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus Sp* sebagian besar terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan yang membentuk struktur yang tebal dan kaku. Kekakuan pada dinding sel bakteri yang disebabkan karena lapisan peptidoglikan dan ketebalan peptidoglikan ini membuat bakteri Gram positif resisten terhadap lisis osmotik. Dinding sel bakteri Gram positif mengandung lapisan peptidoglikan yang tebal dan asam teikoat. Dinding sel bakteri Gram negatif mengandung lapisan peptidoglikan yang tipis, membran luar yang terdiri dari protein, lipoprotein dan lipopolisakarida, daerah periplasma dan membran dalam. Bakteri Gram negatif, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas Sp* terdiri atas satu atau sedikit lapisan peptidoglikan pada dinding selnya (Jawetz *et al.* 2001).

2. Pertumbuhan bakteri

Istilah pertumbuhan umum digunakan untuk bakteri dan mikroorganisme lain dan biasanya mengacu pada perubahan di dalam hasil panen sel (pertambahan total massa sel) dan bukan pertumbuhan individu organisme (Michael *et al.* 2008). Pertumbuhan bakteri berarti jumlah bakteri tersebut bertambah (bukan ukuran sel) dan berakumulasi sebagai koloni yang merupakan populasi yang terdiri atas miliaran sel (Radji 2011).

3. Bakteri *Escherichia coli*

3.1 Morfologi bakteri *Escherichia coli*. *Escherichia coli* memiliki ukuran sel dengan panjang 2,0 – 6,0 μm dan lebar 1,1– 1,5 μm serta berat sel *Escherichia coli* 2 x 10⁻¹² gram. Bakteri ini berbentuk batang, lurus, tunggal, berpasangan atau rantai pendek, termasuk Gram dapat hidup soliter maupun berkelompok, umumnya motil, dan tidak membentuk spora (Carter dan Wise 2004).

Bakteri *Escherichia coli* memiliki sifat anaerobik fakultatif, memiliki hemin sitikrom dan katalase sehingga mampu memperoleh energi baik secara respirasi (aerob) maupun secara fermentasi (anaerob). Saat kondisi aerobik, bakteri *Escherichia coli* mengoksidasi asam amino, sedangkan pada saat kondisi anaerobik, metabolisme *Escherichia coli* bersifat fermentatif dan energi yang diperoleh diproduksi dengan cara mencegah gula menjadi asam organik (Berg 2004).

3.1 Klasifikasi bakteri *Escherichia coli*. Secara garis besar, klasifikasi *Escherichia coli* adalah sebagai berikut.

Kingdom : Bacteria
Subkingdom: Tracheobionta
Filum : Proteobacteria
Kelas : Gamma Proteobacteria
Ordo : Enterobacteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli* (Songer dan Post 2005)

3.2 Metabolisme Bakteri *Escherichia coli*. Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang memiliki sifat mikroaerofilik, beberapa strain bila ditanam pada agar darah menunjukkan hemolisis tipe beta. *Escherichia coli* dapat tumbuh dengan baik pada hampir semua media yang bisa dipakai di laboratorium mikrobiologi. *Escherichia coli* menghasilkan enterotoksin yang disebut *Escherichia coli* enterotoksigen yaitu suatu toksin yang diekskresikan ke dalam medium di sekitarnya yaitu dinding usus. Ada dua macam enterotoksin yang dihasilkan oleh bakteri *Escherichia coli* yaitu toksin yang tahan panas yang disebut ST (*Stabil Thermo*) dan toksin yang tidak tahan panas disebut LT (*Labil Thermo*). Kedua toksin ini dapat menyebabkan diare karena hilangnya sejumlah besar cairan dari usus atau dengan cara invasi langsung lapisan epithelium dinding usus yang menyebabkan peradangan (Prasetyo 2015).

3.3 Habitat Bakteri *Escherichia coli*. Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri flora normal penghuni utama usus besar, hidupnya komensal dalam kolon manusia dan diduga berperan dalam pembentukan vitamin K yang

berperan dalam proses pembekuan darah. Bakteri *Escherichia coli* termasuk kedalam bakteri jenis *Coliform*. Bakteri *Coliform* merupakan bakteri yang berhubungan dengan penyakit pada manusia. Bakteri *Coliform* digolongkan kedalam dua macam yaitu bakteri *Coliform Fecal* dan bakteri *Coliform Nonfecal*. Bakteri *Coliform Fecal* berasal dari tinja manusia dan hewan berdarah panas, sedangkan bakteri *Coliform Nonfecal* bukan berasal dari tinja manusia dan hewan berdarah panas. *Escherichia coli* merupakan bakteri yang patogen karena kemampuannya menyebabkan penyakit saluran pencernaan pada manusia seperti diare (Prasetyo 2015).

3.4 Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. Bakteri *Escherichia coli* mampu menggandakan tubuhnya atau generasi dalam waktu 15 hingga 20 menit menjadi dua kali lipat apabila faktor media, derajat keasaman dan suhu tetap sesuai. Bakteri ini merupakan bakteri tipikal mesofilik yang dapat tumbuh pada suhu 7-10°C sampai 50°C, dengan suhu optimum 37°C pada rentang pH 4-8,5. Badan geometrik eksponensial mencatat bahwa pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dalam waktu 10 jam, satu sel bakteri *Escherichia coli* dapat menggandakan tubuhnya dan berkembang menjadi lebih dari 1 triliun sel. *Escherichia coli* mampu tumbuh di medium nutrisi sederhana, dan dapat memfermentasikan laktosa dengan menghasilkan asam dan gas (Prasetyo 2015).

3.5 Patogenitas *Escherichia coli*. *Escherichia coli* umumnya tidak menimbulkan penyakit, namun pada beberapa kondisi tertentu bakteri ini dapat bersifat patogen. Beberapa keadaan dimana bakteri *Escherichia coli* dapat menjadi patogen antara lain bila berada diluar habitatnya, bila daya tahan tubuh inangnya mengalami penurunan (kelelahan) atau mengalami penyakit tertentu khususnya yang bersifat immunosupresan. Menurut Brooks *et al* (2005) bakteri *Escherichia coli* merupakan mikroflora alami yang terdapat pada saluran pencernaan manusia dan hewan. Beberapa galur *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia adalah *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC), dan *Enteroadgregative Escherichia coli* (EAEC).

Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) merupakan penyebab utama diare pada bayi. EPEC memiliki fimbria, toksin yang tahan panas (ST), toksin yang tidak tahan panas (LT). Ketika berada di dalam usus bakteri ini menggunakan *adhesin* yang dikenal dengan intimin untuk menempel pada mukosa usus, kemudian akan terjadi penghancuran mikrovillus sehingga bakteri ini dapat masuk ke dalam sel yang ada di mukosa usus. EPEC mengakibatkan diare yang berair atau encer yang umumnya dapat sembuh sendiri, tetapi pada kondisi tertentu dapat berkembang menjadi infeksi kronis (Radji 2011; Paramesti 2014).

Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) merupakan bakteri penyebab diare pada anak dan wisatawan yang berpergian ke daerah yang bersanitasi buruk. Faktor kolonisasi yang dimiliki bakteri ETEC bersifat spesifik untuk manusia. Faktor ini akan mengawali perlekatan bakteri ETEC ke sel epitel usus halus. Beberapa strain dari ETEC menghasilkan *heat-labil exotoxin*. Sub unit B bakteri ini akan melekat ke GMI pada *brush border* di epitel usus halus yang akan menyebabkan masuknya sub unit A ke dalam sel. Masuknya sub unit A nantinya akan mengaktifkan adenilat siklase sehingga cAMP meningkat dan terjadilah hipersekresi dari air dan ion serta terlambatnya reabsorpsi ion natrium. Akibatnya, lumen usus akan terisi penuh dengan air dan terjadilah diare (Radji 2011; Paramesti 2014).

Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) menyebabkan diare yang dikenal dengan kolitis hemoragik. Bakteri ini dapat menghasilkan verotoksin yang memiliki efek sitotoksik toksin pada sel vero, yaitu sel ginjal yang diperoleh dari ginjal monyet Afrika. Diare yang disebabkan oleh bakteri ini merupakan bentuk diare yang berat terutama jika disertai dengan *hemolitik uremic syndrom*. Penyakit ini juga dapat menyebabkan gagal ginjal akut, anemia hemolitik, mikroangiopati, dan trombositopenia (Radji 2011; Paramesti 2014).

Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) memiliki mekanisme patologi yang mirip dengan patogenesis infeksi yang disebabkan oleh *Shigella*. EIEC menyebabkan penyakit dengan cara menyerang sel epitel pada mukosa usus. Bakteri ini masuk dan berkembang dalam epitel sel-sel usus sehingga menyebabkan kerusakan pada sel usus (Radji 2011; Paramesti 2014).

Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) dapat menyebabkan diare yang bersifat akut dan kronis. EAEC melekat pada sel manusia dengan pola khas dan menyebabkan diare yang tidak berdarah, tidak menginvasi, dan tidak menyebabkan inflamasi pada mukosa intestin (Radji 2011; Paramesti 2014).

3.6 Pengobatan. Pilihan utama farmakoterapi infeksi *Escherichia coli* menurut *World Health Organization (WHO)* adalah kotrimoksazol. Kotrimoksazol merupakan antibiotik kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol yang sensitif terhadap bakteri Gram negatif dan Gram positif. Kombinasi ini menghasilkan efek bakterisid dibanding jika sulfametoksazol digunakan tunggal. Mekanisme kerjanya trimetoprim mencegah reduksi dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat. Kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol memberikan aktivitas sinergis menghambat sintesis asam folat (Meila 2016).

F. Mekanisme Antibiotik Terhadap Mikroorganisme

Antibiotik awalnya dikenal dengan nama antibiosis yang artinya substansi yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Mikroorganisme dalam perkembangannya dibedakan menjadi bakteri, fungi, protozoa, dan cacing. Antibiotik dapat diklasifikasikan berdasarkan spektrumnya, mekanisme aksi, strain penghasil, cara biosintesis, maupun struktur biokimianya. Berdasarkan spektrumnya, antibiotik dapat dibedakan menjadi antibiotik dengan spektrum luas yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif maupun Gram negatif, dan antibiotik dengan spektrum sempit yang hanya dapat menghentikan pertumbuhan bakteri spesifik pada Gram negatif atau positif saja. Menurut Lullman *et al* (2000) berdasarkan mekanisme aksinya, antibiotik dapat dibedakan menjadi :

1. Antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel

Antibiotik ini bekerja dengan cara merusak lapisan peptidoglikan penyusun dinding sel bakteri. Contoh antibiotik yang bekerja dengan cara ini antara lain adalah golongan penisilin, monolaktam, sefalosporin, karbapenem, basitrasin, vankomisin, dan isoniazid.

2. Antibiotik yang merusak membrane plasma

Membran plasma bersifat semi permeable. Fungsi dari membrane plasma adalah untuk mengendalikan transport metabolit keluar masuk sel. Fungsi ini

dapat terganggu jika strukturnya mengalami kerusakan. Antibiotik jenis ini bekerja dengan merusak struktur membrane plasma sehingga terjadi gangguan fungsi dan akhirnya akan membunuh mikroorganisme tersebut. Antibiotik jenis ini biasanya berasal dari golongan polipeptida seperti polimiksin B, amfoterisin B, mikonazol, dan ketokonazol.

3. Antibiotik yang menghambat sintesis protein

Golongan antibiotik yang memiliki kemampuan untuk menghambat sintesis protein dari mikroorganisme ini antara lain golongan aminoglikosida, tetrasiklin, kloramfenikol, dan makrolida.

Aminoglikosida adalah antibiotik dengan gula amino yang tergabung dalam ikatan glikosida. Umumnya, antibiotik ini memiliki spektrum luas dan sifatnya bakterisidal. Antibiotik jenis ini akan berikatan dengan ribosom bakteri pada subunit 30S yang kemudian akan menghambat traslokasi peptidil-tRNA sehingga terjadi kesalahan pembacaan mRNA, akibatnya bakteri tidak dapat mensintesis protein yang penting untuk pertumbuhan dirinya. Contoh antibiotik golongan ini adalah streptomisin, genamisin, dan tobramisin.

Tetrasiklin dapat menghambat sintesis protein bakteri dengan berikatan pada bagian 16S subunit 30S, sehingga situs A pada ribosom tidak dapat berikatan dengan monoasil-tRNA. Antibiotik golongan ini merupakan antibiotik berspektrum luas yang dapat menjadi penetrasi jaringan tubuh. Contoh antibiotik golongan ini adalah oksitetrasiklin, klortetrasiklin, tetrasiklin, dan doksisisiklin.

Kloramfenikol memiliki struktur yang sederhana dengan ukuran yang kecil sehingga mudah berdifusi ke dalam tubuh. Antibiotik ini menghambat sintesis protein dengan menghalangi aktivitas enzim peptidil transferase pada subunit 50S sehingga ikatan peptida pada asam amino yang baru melekat pada tRNA dan asam amino terakhir terhenti perkembangannya.

Makrolida memiliki cincin lakton makrosiklik yang mampu memasuki dinding sel sebagian besar bakteri Gram negatif. Contoh antibiotik golongan ini adalah eritromisin.

4. Antibiotik yang menghambat sintesis asam nukleat (DNA/RNA)

Antibiotik golongan ini bekerja dengan menghambat proses transkripsi dan replikasi pada proses sintesis asam nukleat bakteri. Contoh antibiotik yang termasuk golongan ini adalah kuinolon dan rifampin.

Rifampin adalah golongan antibiotik turunan rifamisin yang bekerja dengan cara mengikat subunit β -RNA polimerase bakteri sehingga transkripsi mRNA terhambat, sedangkan kuinolon bekerja dengan menghambat enzim DNA girase pada replikasi DNA, sehingga proses replikasi DNA dan transkripsi mRNA terhambat.

5. Antibiotik yang menghambat sintesis metabolit esensial

Antibiotik jenis ini bekerja dengan memberikan kompetitor berupa antimetabolit sehingga sintesis metabolit akan terganggu. Contoh antibiotik jenis ini antara lain adalah sulfanilamid dan para amino benzoic acid (PABA).

G. Media

1. Definisi media

Media adalah bahan yang terdiri dari campuran nutrisi yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme. Mikroorganisme akan tumbuh dan berkembangbiak di dalam atau di atas media tersebut. Media yang digunakan harus steril dan pH harus sesuai dengan kebutuhan mikroba. Media harus dalam keadaan steril, artinya sebelum ditanami bakteri yang dimaksud, media tidak ditumbuhi mikroba lain yang tidak diinginkan (Suriawiria 2005).

Media ada beberapa macam menurut bentuk, sifat, dan susunannya yang ditentukan oleh senyawa penyusun media, prosentase campuran, dan tujuan penggunaan. Media juga digunakan untuk isolasi, identifikasi maupun diferensiasi. Bentuk media ada tiga jenis yaitu media padat, cair, dan semi padat. Media padat apabila kedalam media ditambahkan antara 12-15 gram tepung agar-agar per 1.000 ml media. Tepung agar-agar yang ditambahkan tergantung pada jenis dan kelompok mikroba yang ditambahkan. Media padat umumnya dipergunakan untuk bakteri, ragi, jamur, dan mikroalga. Media cair dapat digunakan pembiakan organisme dalam jumlah besar, fermentasi dan berbagai uji. Media tidak

ditambahkan zat pematat, media cair dipergunakan untuk perbaikan mikroalga terutama bakteri dan ragi. Media semi cair atau semi padat digunakan untuk menguji ada atau tidak mortalitas dan kemampuan fermentasi. Media ini untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup aerobik atau fakultatif (Suriawiria 2005).

2. Jenis-jenis media pertumbuhan bakteri

Jenis-jenis media pertumbuhan bakteri menurut Radji 2011, dibagi menjadi 6 yaitu media biakan khusus, media selektif dan diferensial, media kompleks, media sintetik, media anaerob, dan media pengayaan.

2.1 Media biakan khusus. Media biakan khusus digunakan untuk menentukan tipe pertumbuhan mikroba dan kemampuannya untuk mengadakan perubahan kimia tertentu. Bakteri aerob membutuhkan O₂ dengan konsentrasi lebih tinggi ataupun lebih rendah dari pada konsentrasi CO₂ di udara.

2.2 Media selektif dan diferensial. Media selektif dan diferensial digunakan untuk mendeteksi adanya bakteri spesifik yang berhubungan dengan penyakit atau sanitasi yang buruk. Pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan dapat ditekan dengan menggunakan media selektif, contoh *Bismuth Sulfite Agar*. Media diferensial digunakan untuk membedakan koloni bakteri yang diinginkan dari koloni bakteri lain yang tumbuh pada lempeng media yang sama.

2.3 Media Kompleks. Media kompleks merupakan media yang mengandung nutrisi tinggi, yang terdiri atas ragi, ekstrak daging, tumbuhan, ataupun protein dari sumber lain yang merupakan sumber nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Media kompleks yang berbentuk cair disebut *Nutrient Broth*, sedangkan yang ditambahkan media agar disebut *Nutrient Agar*.

2.4 Media sintetik. Media sintetik digunakan untuk menumbuhkan bakteri kemoheterotrof. Pada uji kadar vitamin secara mikrobiologis, media yang digunakan harus mengandung faktor pertumbuhan yang dibutuhkan oleh bakteri kecuali vitamin yang diuji. Pertumbuhan bakteri akan sebanding dengan jumlah vitamin dalam bahan uji. Organisme yang banyak menumbuhkan faktor pertumbuhan disebut *fastidious*, misalnya *Lactobacillus*.

2.5 Media anaerob. Media anaerob ditanam pada media spesial disebut reducing media yang menggunakan natrium trioglikolat. Media ini sebelum digunakan dipanaskan perlahan-lahan untuk menghilangkan oksigen yang terserap. Bejana anaerob digunakan untuk menginkubasi bakteri anaerob yang diinokulasikan dalam media agar di dalam cawan petri.

2.6 Media pengayaan. Media pengayaan digunakan untuk pengayaan biakan bakteri dan dirancang untuk memperbanyak tipe bakteri yang diinginkan. Media ini berbentuk cair yang hampir sama dengan media selektif. Tahap pengayaan adalah upaya untuk menumbuhkan bakteri dalam beberapa kali pemindahan ke media yang baru. Ketika biakan pengayaan terakhir disebarkan di atas media padat yang mengandung komposisi yang sama dengan media cair, hanya koloni yang mampu menggunakan fenol yang tetap bertahan tumbuh.

H. Sterilisasi

Peralatan maupun bahan yang akan digunakan dalam bidang mikrobiologi harus dalam keadaan steril. Keadaan steril yang dimaksud yaitu bebas dari mikroba yang merusak atau mengganggu dalam proses pengerjaan. 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- α , sinar gamma dan sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan desinfektan, larutan alkohol, dan larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu penggunaan saringan atau filter untuk bahan yang akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemanasan tinggi akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi (Darmadi 2008).

I. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antimikroba dapat dilakukan dengan menggunakan tiga metode, yaitu :

1. Metode dilusi

Sejumlah zat antimikroba dimasukan ke dalam medium bakteriologi padat atau cair. Biasanya digunakan pengenceran dua kali lipat zat antimikroba.

Medium akhirnya diinokulasi dengan bakteri yang diuji dan diinkubasi. Tujuan akhir dari metode dilusi adalah untuk mengetahui seberapa banyak jumlah zat antimikroba yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri yang diuji. Uji dilusi membutuhkan waktu yang banyak dan kegunaannya terbatas pada keadaan-keadaan tertentu. Uji dilusi kaldu tidak praktis dan kegunaannya sedikit apabila dilusi harus dibuat dalam tabung pengujian, namun adanya serangkaian preparat dilusi kaldu untuk berbagai obat yang berbeda dalam lempeng mikrodilusi telah meningkatkan dan mempermudah metode. Keuntungan uji dilusi adalah bahwa uji tersebut memungkinkan adanya hasil yang menunjukkan jumlah obat tertentu yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme yang diuji (Jawetz *et al.* 2007).

Metode dilusi cair (*Broth dilution test*) dilakukan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode ini dilakukan dengan membuat beberapa pengenceran agen antibakteri pada medium cair yang kemudian akan ditambahkan bakteri uji ke dalamnya. Larutan uji dengan kadar terkecil yang memberikan warna jernih ditetapkan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Dari larutan tersebut, akan dilakukan pengkulturan ulang pada media cair tanpa menambahkan apapun, kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam. Jika hasil larutan didapatkan tetap jernih, maka hasil inkubasi tersebut akan ditetapkan sebagai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi padat (*Solid dilution test*) ini serupa dengan metode dilusi cair, yang membedakan adalah media yang digunakan pada metode ini merupakan media padat (Pratiwi S 2008). Metode dilusi menurut Ratnasari (2009) dibagi menjadi beberapa cara, yaitu :

1.1 Cara penapisan lempeng agar. Larutan zat antibakteri dibuat pengenceran kelipatan dan sehingga dilipat berbagai variasi konsentrasi. Hasil pengenceran larutan tersebut dicampur dengan media agar yang telah dicairkan kemudian dijaga pada suhu 45-50°C, dengan perbandingan antara larutan zat antibakteri dengan media adalah satu bagian untuk larutan zat antibakteri dan sembilan bagian untuk media. Media campuran tersebut dituang ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan dingin hingga membeku. Pada tiap cawan petri

ditanamkan dengan suspensi bakteri yang mengandung kira-kira 105-106 CFU/ml, kemudian media cawan petri tersebut dalam posisi terbalik dan diinokulasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Untuk setiap pengenceran digunakan kontrol negatif. Hasil pengamatan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dibaca sebagai konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme, jika terlihat pertumbuhan bakteri tidak jelas atau kabur maka pertumbuhan bakteri dapat dibiakan.

1.2 Cara pengenceran tabung. Larutan zat antibakteri dilarutkan dengan pelarut yang sesuai, kemudian diencerkan dengan medium cair berturut-turut pada tabung yang disusun dalam satu deret hingga konsentrasi terkecil yang dikehendaki. Tiap tabung (yang berisi campuran media dan larutan zat antibakteri dengan berbagai konsentrasi tersebut) ditanami dengan suspensi bakteri yang mengandung kira-kira 105–106 sel bakteri CFU/ml. Selanjutnya dibiakan dalam media tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Pertumbuhan bakteri diamati dengan cara melihat kekeruhan di dalam tabung tersebut, yang disebabkan oleh inokulum bakteri. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media baru tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai KBM.

1.3 Turbidimetri. Metode turbidimetri ini dilakukan dengan suatu turunan protein yang dimurnikan dan dibiakan dalam satuan tuberkulin. Reaksi pada metode ini adalah mengerasnya jaringan yang dengan mudah dapat dirasakan, dengan garis tengah 10 mm atau lebih yang terjadi dalam waktu 48-72 jam setelah penyuntikan di dalam kulit. Uji ini diukur dengan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 530 mm.

2. Metode difusi

Cakram kertas saring atau cawan berliang renik atau silinder tidak beralas yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada media padat yang telah ditanami dengan biakan kuman yang diperiksa. Setelah diinkubasi, garis

tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan obat terhadap organisme yang diperiksa. Metode yang paling luas digunakan adalah uji difusi cakram. Cakram kertas filter yang mengandung sejumlah tertentu obat ditempatkan di atas medium padat yang telah diinokulasi pada permukaan dengan organisme uji. Diameter zona jernih inhibisi di sekitar cakram diukur sebagai ukuran kekuatan inhibisi obat melawan organisme uji tertentu. Metode difusi dipengaruhi banyak faktor fisik dan kimia selain interaksi sederhana antara obat dan organisme (misal, sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekuler, dan stabilitas obat) (Jawetz *et al.* 2007). Metode difusi menurut Ratnasari (2009) dibagi menjadi beberapa cara yaitu:

2.1 Metode Silinder Gelas. Metode silinder yaitu meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa hingga berdiri di atas media agar, diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling silinder.

2.2 Metode kertas cakram disk diffusion. Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling cakram.

2.3 Metode cetak lubang (metode sumur). Metode lubang yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang.

3. Metode Bioautografi

Bioautografi adalah suatu metode pendeteksian untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisasi aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Metode ini memanfaatkan pengerjaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada bioautografi ini didasarkan atas efek biologi berupa antibakteri, antiprotozoa, antitumor dan lain-lain dari substansi yang diteliti (Akhyar 2010).

Ciri khas dari prosedur bioautografi adalah didasarkan atas teknik difusi agar, senyawa antimikrobanya dipindahkan dari lapisan KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji yang peka secara merata. Dari hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu akan terlihat zona hambatan di sekeliling spot dari KLT yang telah ditempelkan pada media agar. Zona hambatan ditampakkan oleh aktivitas senyawa aktif yang terdapat di dalam bahan yang diperiksa terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji. Bioautografi menurut Akhyar (2010) dapat dibagi atas tiga kelompok, yaitu:

3.1 Bioautografi langsung. Bioautografi langsung merupakan suatu metode dimana mikroorganisme akan tumbuh secara langsung di atas lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Prinsip kerja dari metode ini adalah suspensi mikroorganisme uji yang peka dalam medium cair disemprotkan pada permukaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang telah dihilangkan sisa-sisa eluen yang menempel pada lempeng kromatogram. Setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

3.2 Bioautografi kontak. Bioautografi kontak merupakan suatu metode dimana senyawa antimikroba dipindahkan dari lempeng KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan bakteri uji yang peka secara merata dan melakukan kontak langsung. Metode ini didasarkan atas difusi dari senyawa yang telah dipisahkan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) atau kromatografi kertas.

3.3 Bioautografi pencelupan. Bioautografi pencelupan merupakan suatu metode dimana medium agar telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri dituang di atas lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

J. Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum

1. Konsentrasi Hambat Minimum

Aktivitas antibakteri ditentukan oleh spektrum kerja, cara kerja dan ditentukan pula oleh Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimum dari suatu zat yang mempunyai

efek daya hambat pertumbuhan mikroorganisme (ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung), setelah diinkubasikan dengan suhu 37°C selama 18-24 jam (Nuraina 2015). Menurut Nuraina 2015 penetapan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat dilakukan dengan dua cara yaitu :

1.1 Cara cair. Cara cair menggunakan media cair yang telah ditambahkan zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau jamur dengan pengenceran tertentu kemudian diinokulasikan biakan bakteri atau jamur dalam jumlah yang sama. Respon zat uji ditandai dengan kejernihan atau kekeruhan pada tabung setelah diinkubasi.

1.2 Cara padat. Cara padat menggunakan media padat yang telah dicampur dengan larutan zat uji dengan berbagai konsentrasi. Dengan cara ini satu cawan petri dapat digores lebih dari satu jenis mikroba untuk memperoleh nilai KHM. Aktivitas antimikroba dari ekstrak tanaman diklasifikasikan kuat jika nilai KHM $<100 \mu\text{g/mL}$, sedang jika $100 > \text{KHM} \leq 625 \mu\text{g/mL}$ dan lemah jika nilai KHM $>625 \mu\text{g/mL}$.

2. Konsentrasi Bunuh Minimum

KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) merupakan kadar terendah dari antimikroba yang dapat membunuh bakteri (ditandai dengan tidak tumbuhnya kuman pada medium padat) atau pertumbuhan koloninya kurang dari 0,1% dari jumlah koloni inokulum awal pada medium padat yang telah dilakukan penggoresan sebanyak satu ose sebelumnya (Nuraina 2015).

K. Efek Kombinasi Obat

Kombinasi obat adalah perpaduan antara dua obat atau lebih yang digunakan pada waktu yang bersamaan agar khasiatnya masing-masing dapat saling mempengaruhi, yakni dapat memperlihatkan efek antagonis (kerja berlawanan) atau efek sinergisme (kerja sama). Efek kombinasi obat menurut Tjay dan Rahardja 2006, yaitu :

1. Sinergisme

Sinergisme adalah kerja sama antara obat yang dikombinasikan. Sinergisme ada dua jenis yaitu adisi dan potensiasi. Adisi (penambahan) yaitu

efek kombinasi sama dengan jumlah kegiatan masing-masing obat. Potensiasi (peningkatan potensi) yaitu obat saling memperkuat khasiatnya sehingga terjadi efek yang melebihi jumlah matematis.

2. Antagonis

Antagonis terjadi apabila efek obat pertama dikurangi atau ditiadakan sama sekali oleh kedua obat yang memiliki khasiat farmakologi berlawanan.

L. Diare

Diare merupakan penyakit yang banyak dialami oleh manusia. Diare dapat didefinisikan sebagai buang air besar berbentuk cair, atau setengah cair, dengan kandungan feses lebih banyak dari biasanya, lebih dari 200 gram atau 200 ml/24 jam. Definisi lain dari diare yakni buang air besar encer dengan frekuensi lebih dari 3 kali dengan atau tanpa disertai darah. Menurut *World Gastroenterology Organization Global Guidelines 2005*, diare disebut akut bila kurang dari 14 hari (Sudoyo *et al.* 2009).

Diare merupakan gejala yang sering dikeluhkan orang dewasa. Prevalensi terjadinya diare akut atau gastroenteritis akut pada orang dewasa mencapai 99.000.000 kasus setiap tahunnya. Kematian akibat diare sering dilaporkan terjadi terutama pada anak dan orang dengan usia lanjut. Hal ini berkaitan dengan daya tahan tubuh yang lebih rendah sehingga rentan mengalami dehidrasi sedang sampai berat (Sudoyo *et al.* 2009).

Diare akut dapat disebabkan oleh berbagai etiologi, baik infeksi maupun non infeksi. Penyebab non infeksi diare akut dapat berupa keracunan makanan, alergi, malabsorpsi, imunodefisiensi, terapi obat seperti antibiotik, antasid, dan kemoterapi, tindakan medis tertentu seperti gastrektomi dan lainnya. Sedangkan penyebab infeksi dari diare akut dapat berupa infeksi bakteri, virus, dan parasit.

Pada penelitian yang dilakukan di Rumah Sakit Persahabatan oleh Hendarwanto *et al* didapatkan etiologi diare karena infeksi terbanyak disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli*. *Escherichia coli* tergolong bakteri yang normal

hidup di usus besar manusia, dan biasanya tidak membahayakan, tetapi beberapa strain bakteri ini dapat menyebabkan keracunan makanan (Paramesti 2014).

M. Landasan Teori

Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman hayati yang kaya, sekitar 40.000 spesies tumbuhan ditemukan di Indonesia dan 180 spesies di antaranya berpotensi sebagai tanaman obat (Wulandari 2011). Salah satu tanaman yang digunakan dalam pengobatan yaitu tanaman binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis). Secara tradisional tanaman binahong dikenal oleh masyarakat untuk mengobati berbagai macam penyakit salah satunya adalah penyakit infeksi. Ekstrak daun binahong dapat menjadi antibakterial dengan kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, polifenol, saponin, alkaloid, terpenoid, minyak atsiri, dan tanin (Umar *et al.* 2012).

Penelitian yang dilakukan oleh Sari (2011) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun binahong memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*. KHM kualitatif ekstrak etanol daun binahong terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro* adalah 3,9 mg/ml. KHM kuantitatif ekstrak etanol daun binahong terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro* adalah 2,1208 mg/ml.

Tanaman lain yang mengandung antibakteri adalah tanaman talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott). Menurut penelitian Arisandi (2016) daun talas memiliki kandungan yaitu flavonoid, saponin, terpen, tanin, dan alkaloid yang memiliki khasiat sebagai antibakteri. Ekstrak etanol 96% dari daun talas menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dengan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah 20% b/v.

Escherichia coli adalah bakteri Gram negatif batang yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi primer pada usus, misalnya diare (Jawet *et al.* 2007). Beberapa galur *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia adalah *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), *Enteroinvasive*

Escherichia coli (EIEC), dan *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC) (Brooks *et al.* 2005).

Penelitian mengenai kombinasi dua ekstrak pernah dilakukan oleh Yuniarti (2008) mendapatkan hasil bahwa kombinasi infus daun sirih dan daun salam dapat meningkatkan daya hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus in vitro* dibandingkan dengan sediaan tunggal. Pada penelitian ini dilakukan kombinasi dari daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) untuk menguji aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Uji pendahuluan dilakukan dengan metode dilusi untuk mengetahui zona hambat dari ekstrak etanol daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, dan 3:1. Masing-masing ekstrak tunggal dan salah satu dari variasi kombinasi ekstrak yang memiliki zona hambat paling besar, akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi. Metode dilusi dilakukan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Keuntungan uji dilusi adalah adanya hasil yang menunjukkan jumlah obat tertentu yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme yang diuji (Jawetz *et al.* 2007).

Daun binahong dan daun talas yang digunakan diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Keuntungan ekstraksi dengan cara maserasi adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana. Daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) memiliki kandungan kimia yang berguna sebagai antibakteri. Diharapkan kombinasi ini dapat memberikan efek yang lebih optimal dari pada bentuk tunggal ekstrak.

N. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu :

1. Dapat diketahui ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) atau kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, dan 3:1, memiliki aktivitas antibakteri paling efektif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

2. Dapat ditentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, atau 3:1, terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) yang diperoleh dari Ngawi, Jawa Timur.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) segar, berwarna hijau, bebas dari penyakit, bersih, tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua yang diambil dari Desa Ngawi, Jawa Timur.

B. Variable Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variable utama pertama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun binahong dan daun talas beserta kombinasi keduanya.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang sudah diidentifikasi dahulu dapat diidentifikasi kembali dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel kendali, variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dapat dirubah dan direncanakan untuk diketahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi dari ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) dengan perbandingan kombinasi 1:1, 1:3, dan 3:1.

Variabel tergantung adalah variabel yang dapat berubah karena variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah adanya aktivitas antibakteri

ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media uji yang dilihat dari nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

Variabel terkontrol adalah variabel yang berpengaruh terhadap variabel terikat. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah ekstrak daun binahong dan daun talas, bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, sterilisasi, suhu, kondisi peneliti, media, metode penelitian, dan kondisi laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) adalah daun binahong yang sehat, berwarna hijau, dan bebas dari penyakit yang diambil secara acak di daerah Ngawi, Jawa Timur.

Kedua, daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) adalah daun talas yang sehat, berwarna hijau, dan bebas dari penyakit yang diambil secara acak di daerah Ngawi, Jawa Timur.

Ketiga, Serbuk daun binahong adalah daun binahong yang berwarna hijau, segar, dan bebas dari penyakit yang telah diambil kemudian dicuci bersih dengan air yang mengalir hingga tidak ada kotoran dan debu yang menempel, setelah itu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan kurang lebih 5 hari dan dilanjutkan pengeringan menggunakan oven suhu 50°C hingga kering dihaluskan sehingga menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Keempat, Serbuk daun talas adalah daun talas yang berwarna hijau, segar, dan bebas dari penyakit yang telah diambil kemudian dicuci bersih dengan air yang mengalir hingga tidak ada kotoran dan debu yang menempel, setelah itu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan kurang lebih 5 hari dan dilanjutkan pengeringan menggunakan oven suhu 50°C hingga kering dihaluskan sehingga menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Kelima, Ekstrak daun binahong adalah ekstrak cair dari maserasi daun binahong kering dengan pelarut etanol 96%.

Keenam, Ekstrak daun talas adalah ekstrak cair hasil dari maserasi daun talas kering dengan pelarut etanol 96%.

Ketujuh, kombinasi ekstrak daun binahong dan daun talas 1:1 adalah serbuk daun binahong 250 gram dan serbuk daun talas 250 gram dimaserasi dengan etanol 96%.

Kedelapan, kombinasi ekstrak daun binahong dan daun talas 1:3 adalah serbuk daun binahong 125 gram dan serbuk daun talas 375 gram dimaserasi dengan etanol 96%.

Kesembilan, kombinasi ekstrak daun binahong dan daun talas 3:1 adalah serbuk daun binahong 375 gram dan serbuk daun talas 125 gram dimaserasi dengan etanol 96%.

Kesepuluh, Bakteri uji dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiolog Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kesebelas, penentuan aktivitas antibakteri adalah dengan metode dilusi pengujian dengan membuat konsentrasi ekstrak tunggal daun binahong dan ekstrak tunggal daun talas serta kombinasi daun binahong dan daun talas dengan perbandingan kombinasi 1:1, 1:3, dan 3:1 yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian diamati dengan melihat kekeruhan.

Keduabelas, uji aktivitas antibakteri adalah uji dengan menggunakan metode dilusi. Metode dilusi merupakan metode yang menggunakan antimikroba dengan kadar menurun. Seri konsentrasi pengenceran 33,33%; 16,66%; 8,33%; 4,16%; 2,08%; 1,04%; 0,52%; 0,26%; 0,13%; 0,06%.

Ketigabelas, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasinya yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Keempatbelas, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasinya yang dapat membunuh bakteri *Escherichia coli*.

Kelimabelas, Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan mengamati kadar terkecil yang masih jernih yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Penentuan nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan penggoresan larutan uji hasil nilai Konsentrasi Hambat

Minimum (KHM) pada media padat *Endo Agar*. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, yang ditandai dengan ada atau tidak pertumbuhan bakteri pada media tersebut (Nuraina 2015).

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam uji mikrobiologi antibakteri adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) yang dikeringkan (simplisia).

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, HCl, Mg, Aquadest, FeCl₃, CHCl₃, H₂SO₄ 2N, dan H₂SO₄ pekat, NaCl, DMSO 1%, amil alkohol, reagen Mayer, reagen Dragendorff, kristal violet, lautan lugol, iodin, dan safranin.

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Endo Agar* (EA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Klinger Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Simmons Citrate*, *Mueller Hinton Agar* (MHA).

Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Alat

Alat yang digunakan yaitu wadah bak kecil, pisau atau gunting, ayakan nomor 40, oven, blender, erlenmeyer atau botol coklat tertutup, beaker glass 100ml/2000ml, gelas ukur 5ml/50ml/100ml, corong kaca, kertas saring, *rotary evaporator*, *moisture balance*, corong buchner, pompa vakum, erlenmeyer vakum, inkubator 37°C, korek api, rak tabung, tabung reaksi, cawan petri, mikropipet, ose steril, lampu bunsen, pipet volum, pipet tetes, sarung tangan, masker.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi dan identifikasi tanaman daun binahong dan daun talas

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel, daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) yang berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopis, serta

mencocokkan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) terhadap kepustakaan yang dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret.

2. Pengambilan dan pengumpulan bahan

Sampel berupa daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) didapatkan dalam keadaan sampel basah berupa daun segar diperoleh dari Ngawi, Jawa Timur.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Daun binahong dan daun talas yang telah diperoleh, selanjutnya dilakukan sortasi basah serta dicuci untuk menghilangkan pengotor yang masih menempel pada bahan. Sortasi dilakukan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji, kemudian dicuci bersih, ditiriskan dan dirajang, setelah itu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan kurang lebih 5 hari dan dilanjutkan pengeringan menggunakan oven suhu 50°C hingga kering. Simplisia yang sudah kering ditimbang bobotnya, lalu disortasi kembali dari kotoran-kotoran yang tertinggal. Simplisia yang telah disortir, diblender menjadi serbuk halus dan diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh derajat kehalusan yang diinginkan.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dan daun talas

Penetapan kadar lembab daun binahong dengan daun talas dilakukan dengan alat *moisture balance*. Timbang serbuk daun binahong dan daun talas sebanyak 2 gram, suhu yang digunakan 95°C dan waktu pengeringan secara manual yaitu selama 15 menit. Penandaan hasil analisis telah selesai yaitu sampai diperoleh bobot konstan yang dilakukan penimbangan sampai 3 kali. Susut pengeringan suatu serbuk simplisia akan memenuhi syarat apabila tidak lebih dari 10%.

5. Pembuatan ekstrak

5.1 Pembuatan ekstrak etanol daun binahong. Disiapkan serbuk simplisia daun binahong dan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 10:75 yaitu 10 bagian serbuk simplisia dan 75 bagian cairan penyari. Metode ekstraksi yang

digunakan adalah metode maserasi. 500 gram serbuk daun binahong dimasukkan ke dalam botol maserasi, ditambahkan 3750 ml pelarut etanol 96%, direndam selama 5 hari dan sesekali digojok. Ekstrak yang didapat disaring, kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 65°C.

5.2 Pembuatan ekstrak etanol daun talas. Disiapkan serbuk simplisia daun talas dan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 10:75 yaitu 10 bagian serbuk simplisia dan 75 bagian cairan penyari. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. 500 gram serbuk daun talas dimasukkan ke dalam botol maserasi, ditambahkan 3750 ml pelarut etanol 96%, direndam selama 5 hari dan sesekali digojok. Ekstrak yang didapat disaring, kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 65°C.

5.2 Pembuatan ekstrak etanol daun binahong dan daun talas 1:1. Disiapkan serbuk simplisia daun binahong, serbuk daun talas, dan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 10:75 yaitu 10 bagian serbuk simplisia dan 75 bagian cairan penyari. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi dengan perbandingan 1:1 yaitu 250 gram serbuk daun binahong dan 250 gram serbuk daun talas. Serbuk dimasukkan ke dalam botol maserasi, ditambahkan 3750 ml pelarut etanol 96%, direndam selama 5 hari dan sesekali digojok. Ekstrak yang didapat disaring, kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 65°C.

5.3 Pembuatan ekstrak etanol daun binahong dan daun talas 1:3. Disiapkan serbuk simplisia daun binahong, serbuk daun talas, dan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 10:75 yaitu 10 bagian serbuk simplisia dan 75 bagian cairan penyari. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi dengan perbandingan 1:3 yaitu 125 gram serbuk daun binahong dan 375 gram serbuk daun talas. Serbuk dimasukkan ke dalam botol maserasi, ditambahkan 3750 ml pelarut etanol 96%, direndam selama 5 hari dan sesekali digojok. Ekstrak yang didapat disaring, kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 65°C.

5.4 Pembuatan ekstrak etanol daun binahong dan daun talas 3:1. Disiapkan serbuk simplisia daun binahong, serbuk daun talas, dan pelarut etanol

96% dengan perbandingan 10:75 yaitu 10 bagian serbuk simplisia dan 75 bagian cairan penyari. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi dengan perbandingan 3:1 yaitu 375 gram serbuk daun binahong dan 125 gram serbuk daun talas. Serbuk dimasukkan ke dalam botol maserasi, ditambahkan 3750 ml pelarut etanol 96%, direndam selama 5 hari dan sesekali digojok. Ekstrak yang didapat disaring, kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 65°C.

6. Uji bebas etanol ekstrak daun binahong dan daun talas

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak daun binahong dan daun talas sudah bebas etanol. Uji dilakukan dengan melakukan uji esterifikasi etanol menggunakan reagen asam sulfat dan asam asetat. Masing-masing ekstrak ditambahkan asam sulfat dan asam asetat kemudian dipanaskan, hasil uji bebas etanol dalam ekstrak ditandai dengan tidak terdapat bau ester yang khas dari etanol.

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun binahong dan daun talas

Penapisan fitokimia dilakukan untuk melihat kandungan golongan senyawa yang terdapat di dalam ekstrak daun talas dan daun binahong. Pengujian fitokimia meliputi :

7.1 Flavonoid. Skrining fitokimia flavonoid, Sampel sebanyak 0,1 g ditambahkan 10 mL air panas, didihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat yang didapat kemudian ditambahkan 0,5 g serbuk Mg, 1 mL HCl pekat dan amil alkohol. Campuran dikocok kuat, sampel dinyatakan positif apabila timbul warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah *et al.* 2014).

7.2 Saponin. Skrining fitokimia saponin, Sampel sebanyak 0,05 mg dilarutkan kedalam 20 mL air panas. Kocok dengan kuat, tambahkan 1 tetes HCl 2N. Sampel dinyatakan positif jika busa masih terbentuk selama 30 menit setelah penetesan HCl 2 N (Alamsyah *et al.* 2014).

7.3 Tanin. Skrining fitokimia tanin, Sampel tepung sebanyak 0,05 mg didihkan dalam 20 mL air lalu disaring. Filtrat ditambahkan FeCl₃ 1 %, vortek

hingga mengalami perubahan warna. Sampel dinyatakan positif apabila mengalami perubahan warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Alamsyah *et al.* 2014).

7.4 Terpenoid. Skrining fitokimia terpenoid, sejumlah 1 ml larutan ekstrak ditambah 5 ml anhidrida asetat dan 5 ml CHCl_3 selanjutnya ditambah H_2SO_4 pekat setetes demi setetes sebanyak 0,2 ml ke dasar tabung dan diamati terbentuk cincin coklat pada batas larutan (Siadi 2012).

7.5 Alkaloid. Skrining fitokimia alkaloid, Sampel sebanyak 0,05 mg dilarutkan kedalam 10 tetes asam sulfat 2 N kemudian direaksikan menggunakan pereaksi alkaloid seperti *Dragendorff* dan *Mayer*. Sampel dinyatakan positif apabila terbentuk endapan merah sampai jingga pada pereaksi *Dragendorff* dan terbentuk endapan putih kekuningan pada pereaksi *Mayer* (Alamsyah *et al.* 2014).

8. Sterilisasi Alat.

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian uji aktivitas antimikroba ini harus disterilkan terlebih dahulu. Ose dan pinset dibakar dengan pembakaran di atas api langsung, alat-alat gelas disterilkan dengan oven pada suhu 170°C selama 1-2 jam. Media disterilkan dalam *autoklaf* selama 15 menit pada suhu 121°C (Deby *et al.* 2012).

9. Identifikasi Bakteri Uji

9.1 Isolasi. Isolasi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, suspensi *Escherichia coli* diinokulasikan pada media *Endo Agar* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif bila penampakan koloni dengan kilat logam dan warna medium merah violet (Volk dan Wheller 1988).

9.2 Identifikasi Morfologi dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif ditandai dengan sel bakteri yang berwarna merah dan berbentuk batang. Pewarnaan gram dilakukan dengan cara membuat preparat ulas yang difiksasi lalu tetes Kristal Violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Cuci dengan aquadest mengalir kemudian tetesi mordant (lugols iodine/Gram B) sebagai penguat warna dan diamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci lagi

dengan air mengalir dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, setelah itu preparat dilunturkan dengan alkohol (Gram C) dan didiamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian dikeringkan. Larutan safranin (Gram D) diberikan selama 3 menit, dicuci dengan air mengalir dan keringkan. Minyak imersi diberikan di atas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop perbesaran 10x/100x.

9.3 Identifikasi fisiologi dengan uji biokimia

9.3.1 *Sulfide Indol Motilitas (SIM)*. Biakan murni bakteri diinokulasi pada permukaan media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji adanya sulfida indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif bila berwarna hitam. Uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah reagen *Erlich* A dan B. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Hasil tersebut bisa dituliskan dengan tanda (-++).

9.3.2 *Klinger Iron Agar (KIA)*. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinokulasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, adanya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas yang ditandai dengan pecahnya media (ditulis G), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+), hasil positif dapat dituliskan yaitu A/A S-.

9.3.3 *Lisin Iron Agar (LIA)*. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinokulasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya lisin deaminasi dan dekarboksilase. Selanjutnya diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna merah (ditulis R). Berwarna kuning berarti suasana asam (ditulis A), bila berwarna ungu berarti tetap karena bakteri tidak dapat memecah lisin (ditulis K). Terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+). Hasil positif dapat dituliskan yaitu K/K S-.

9.3.4 Simmons Citrate. Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon. Uji ini bila media berwarna biru. Hasil positif dapat dituliskan yaitu warna hijau (-).

10. Pembuatan suspensi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922

Pengambilan suspensi dilakukan dengan mengambil biakan murni kurang lebih 2 ose bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Suspensi tersebut dimasukan ke dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kemudian kekeruhannya distandarkan dengan *McFarland* 0,5 yaitu setara dengan 10^8 CFU/ml bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Tujuan distandarkannya dengan *McFarland* 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan selama penelitian sama dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian. Tahap selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

11. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Uji pendahuluan dilakukan menggunakan metode difusi. Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui ekstrak etanol daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, dan 3:1 yang memiliki zona hambat paling besar. Uji dilakukan dengan menggoreskan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Metode difusi yang digunakan yaitu menggunakan “*boor prop*”, selanjutnya sumuran diisi dengan ekstrak etanol daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, dan 3:1 sebanyak 50µl. Setelah semua sumuran dalam cawan terisi, inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasilnya diamati kemudian diukur diameter daerah hambat yang jernih menggunakan jangka sorong yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar sumuran akan menunjukkan ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi dengan perbandingan 1:1, 1:3, dan 3:1 yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Kombinasi ekstrak yang memiliki zona hambat paling efektif, akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi dengan masing-masing ekstrak tunggal.

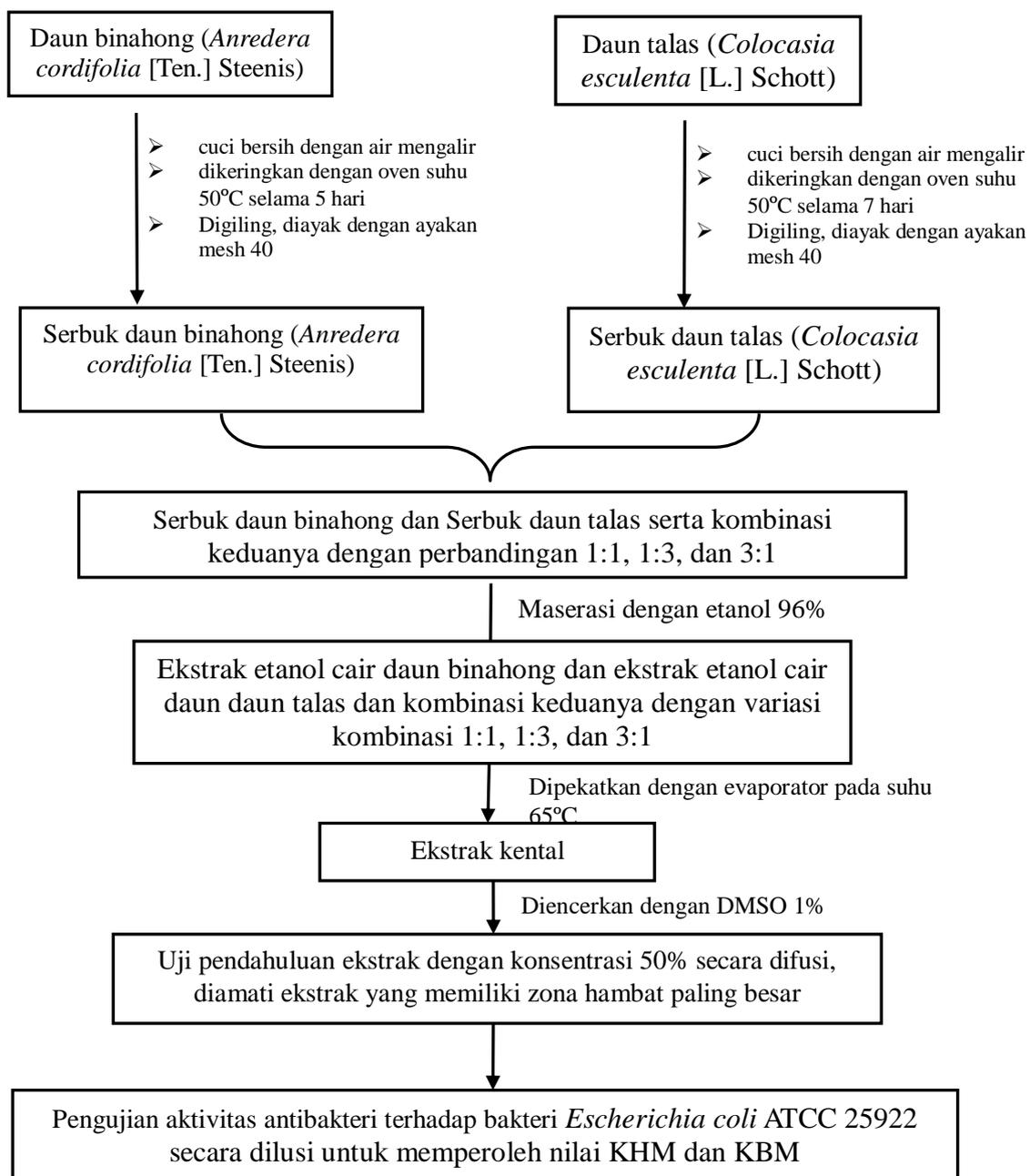
Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode dilusi. Metode dilusi bertujuan untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) pada sediaan ekstrak. Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 12 tabung steril. Konsentrasi larutan stok yaitu 50%, dengan menggunakan pengencer DMSO 1%. Seri konsentrasi yang digunakan pada metode dilusi adalah 33,33%; 16,66%; 8,33%; 4,16%; 2,08%; 1,04%; 0,52%; 0,26%; 0,13%; 0,06%. Tabung pertama sebagai kontrol negatif yang berisi sediaan ekstrak dan tabung terakhir sebagai kontrol positif yang berisi suspensi uji *Escherichia coli* ATCC 25922. Secara aseptis masukan sediaan ekstrak 1 ml pada tabung ke 1 dan 1 ml pada tabung ke 2. Masukan 0,5 ml media BHI pada tabung ke 2 sampai tabung ke 11. Dipipet 0,5 ml pada tabung ke 2 dan dimasukkan ke dalam tabung ke 3 dan dihomogenkan, begitu seterusnya hingga tabung ke 11 lalu dibuang. Dilakukan secara aseptis dan masukan 0,5 ml suspensi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 dari tabung 2 sampai tabung ke 11. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi yang diperoleh disebut sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum dengan cara tabung media yang jernih diinokulasikan secara goresan dalam cawan petri pada media *Endo Agar*. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu diamati ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media. Konsentrasi yang terendah pada media yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh disebut sebagai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

E. Analisa Hasil

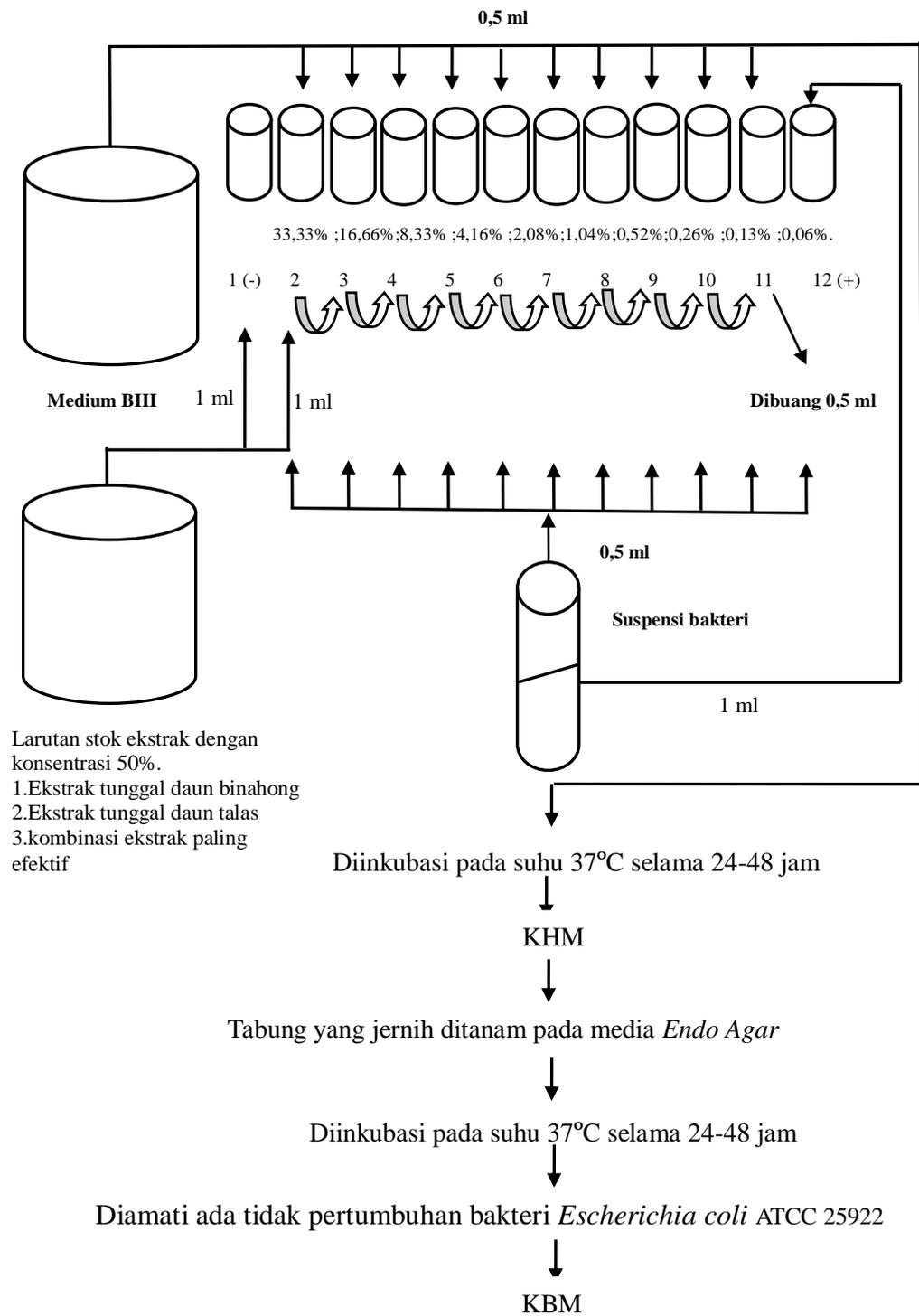
Data hasil penelitian diperoleh nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari sediaan ekstrak kombinasi daun Talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) dan daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis). Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan mengamati kadar terkecil yang masih jernih yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Penentuan nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan penggoresan larutan uji hasil nilai Konsentrasi Hambat

Minimum (KHM) pada media padat *Endo Agar*. Data yang diperoleh dianalisa menggunakan *analysis of varian* (ANOVA) satu jalan. Apabila dari salah satu syarat untuk uji ANOVA tidak dipenuhi, dilakukan uji Kruskal-Wallis untuk melihat adanya perbedaan.

F. Skema Penelitian



Gambar 3. Skema proses pembuatan ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi 1:1, 1:3, dan 3:1



Gambar 4. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Identifikasi tanaman daun binahong dan daun talas

Identifikasi tanaman bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diteliti dan untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan dan pengumpulan bahan. Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman daun binahong dan daun talas yang telah diidentifikasi di Laboratorium Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa benar tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott). Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1 dan 2.

2. Hasil pembuatan serbuk daun binahong dan daun talas

2.1 Pengumpulan bahan. Daun binahong dan daun talas diambil dalam keadaan segar dan berwarna hijau dari tanaman binahong dan talas yang tumbuh di Desa Ngawi, Jawa Timur pada bulan Oktober 2017. Gambar tanaman dan daun talas dapat dilihat pada lampiran 3.

2.2 Pengeringan daun binahong dan daun talas. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air, sehingga tidak mudah ditumbuhi bakteri, kapang, dan mikroorganisme lainnya agar dapat disimpan dalam waktu yang relatif lama, serta memudahkan proses pengolahan selanjutnya. Daun binahong dan daun talas dikeringkan pada oven dengan suhu 50°C selama 5 sampai 7 hari, kemudian dilakukan perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong dan daun talas. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong dan daun talas dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah

| | Bobot basah (gram) | Bobot kering (gram) | Rendemen (b/b) |
|---------------|--------------------|---------------------|----------------|
| Daun binahong | 7.000,00 | 2.550,00 | 36,42% |
| Daun talas | 12.000,00 | 2.150,00 | 17,91% |

Berdasarkan hasil pengeringan daun binahong diperoleh rendemen 36% b/b dan daun talas diperoleh rendemen 17% b/b. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada lampiran 9.

3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dan daun talas

Penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dan daun talas dilakukan dengan penggunaan alat *moisture balance*. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dan daun talas dapat dilihat pada tabel 2 dan 3.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong menggunakan alat *moisture balance*

| | Bobot awal (gram) | Bobot akhir (gram) | Susut kering (%) |
|-----------------|-------------------|--------------------|------------------|
| Serbuk binahong | 2,000 | 1,830 | 8,30 |
| | 2,000 | 1,830 | 8,20 |
| | 2,000 | 1,830 | 8,30 |
| Rata-rata ± SD | | | 8,26% ± 0,05 |

Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun talas menggunakan alat *moisture balance*

| | Bobot awal (gram) | Bobot akhir (gram) | Susut kering (%) |
|----------------|-------------------|--------------------|------------------|
| Serbuk talas | 2,000 | 1,830 | 8,40 |
| | 2,000 | 1,830 | 8,40 |
| | 2,000 | 1,830 | 8,30 |
| Rata-rata ± SD | | | 8,36% ± 0,05 |

Berdasarkan tabel 2 penetapan susut pengeringan yang dilakukan 3 kali replikasi dengan alat *moisture balance*, didapatkan rata-rata prosentase susut pengeringan serbuk daun binahong 8,26% dan serbuk daun talas 8,36%. Penetapan susut pengeringan tidak boleh lebih dari 10%, karena jika susut pengeringan lebih dari 10% menunjukkan bahwa kadar air dalam serbuk terlalu tinggi, yang dapat menurunkan kualitas simplisia. Susut pengeringan kurang dari 10 % dapat mencegah pertumbuhan jamur maupun bakteri sehingga bahan lebih stabil dalam penyimpanan (Katno *et al.* 2008). Berdasarkan dari penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dan serbuk daun talas dapat disimpulkan bahwa serbuk daun binahong dan serbuk daun talas ini memenuhi syarat karena tidak melebihi dari 10%. Perhitungan penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada lampiran 10.

4. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan perbandingan 1:1, 1:3, dan 3:1.

Serbuk daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan perbandingan 1:1, 1:3, dan 3:1 masing-masing diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Maserasi dilakukan menggunakan etanol karena merupakan pelarut pengekstraksi yang mempunyai *extractive power* yang terbaik untuk hampir semua senyawa (Veronita F *et al.* 2017). Ekstrak cair yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 65°C. Perhitungan kombinasi serbuk daun binahong dan daun talas dapat dilihat pada lampiran 11 dan hasil pembuatan ekstrak etanol daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dapat dilihat pada tabel 4. Perhitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada lampiran 12.

Tabel 4. Rendemen ekstrak etanol daun binahong dan daun talas

| | Berat serbuk (gram) | Berat wadah kosong (gram) | Berat wadah + ekstrak (gram) | Berat ekstrak (gram) | Rendemen (b/b) |
|---------------|------------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------|
| Daun binahong | 500,00 | 141,186 | 166,955 | 25,769 | 5,15% |
| Daun talas | 500,00 | 178,705 | 203,602 | 24,896 | 4,98% |
| Kombinasi 1:1 | 500,00 | 167,108 | 193,326 | 26,218 | 5,24% |
| Kombinasi 1:3 | 500,00 | 169,446 | 195,464 | 26,017 | 5,20% |
| Kombinasi 3:1 | 500,00 | 144,531 | 173,018 | 28,487 | 5,70% |

5. Hasil uji bebas etanol daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan perbandingan 1:1, 1:3, dan 3:1

Ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dilakukan tes bebas etanol dengan uji esterifikasi etanol menggunakan reagen asam sulfat dan asam asetat. Hasil uji bebas etanol ekstrak dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya

| Prosedur | Bahan uji | Hasil | Pustaka |
|---|---|---|--|
| Ekstrak + H ₂ SO ₄ conc + CH ₃ COOH, dipanaskan | ekstrak daun binahong, ekstrak daun talas, ekstrak kombinasi 1:1, 1:3, dan 3:1 | Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol | Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol (DepKes RI 1987) |

Hasil uji bebas etanol pada tabel 4 menunjukkan bahwa ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan perbandingan 1:1, 1:3, dan 3:1 sudah terbebas dari pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi yaitu

etanol 96% yang ditunjukkan dengan tidak tercium bau ester yang khas dari etanol. Uji bebas etanol bertujuan untuk membuktikan bahwa masing-masing ekstrak tersebut sudah tidak mengandung etanol yang memiliki aktivitas antibakteri, sehingga tidak mengganggu aktivitas dari masing-masing ekstrak.

6. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun binahong dan daun talas

Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun binahong dan ekstrak daun talas dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terkandung dalam daun binahong dan daun talas. Hasil identifikasi secara kualitatif dengan reaksi warna terhadap serbuk dan ekstrak daun binahong dan daun talas dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun binahong dan daun talas

| Kandungan kimia | Hasil | | Pustaka | Interpretasi data | |
|------------------|--|--|--|-------------------|-----|
| | A | B | | A | B |
| Flavonoid | Merah pada lapisan amil alkohol | Merah pada lapisan amil alkohol | Warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah <i>et al.</i> 2014) | (+) | (+) |
| Saponin | Terbentuk buih tetap | Terbentuk buih tetap | Terbentuk buih tetap selama 30 menit setelah peneteskan HCL 2N (Alamsyah <i>et al.</i> 2014) | (+) | (+) |
| Tanin | Coklat kehijauan | Biru kehitaman | Terjadi perubahan warna coklat kehijauan/ biru kehitaman (Alamsyah <i>et al.</i> 2014) | (+) | (+) |
| Terpenoid | Terbentuk cincin coklat pada batas larutan | Terbentuk cincin coklat pada batas larutan | Terbentuk cincin coklat pada batas larutan (Siadi 2012) | (+) | (+) |
| Alkaloid | HCl + <i>mayer</i> endapan putih sampai kuning, <i>Dragendorff</i> endapan merah sampai jingga | HCl + <i>mayer</i> endapan putih sampai kuning, <i>Dragendorff</i> endapan merah sampai jingga | HCl + <i>mayer</i> endapan putih sampai kuning, <i>Dragendorff</i> endapan merah sampai jingga (Alamsyah <i>et al.</i> 2014) | (+) | (+) |

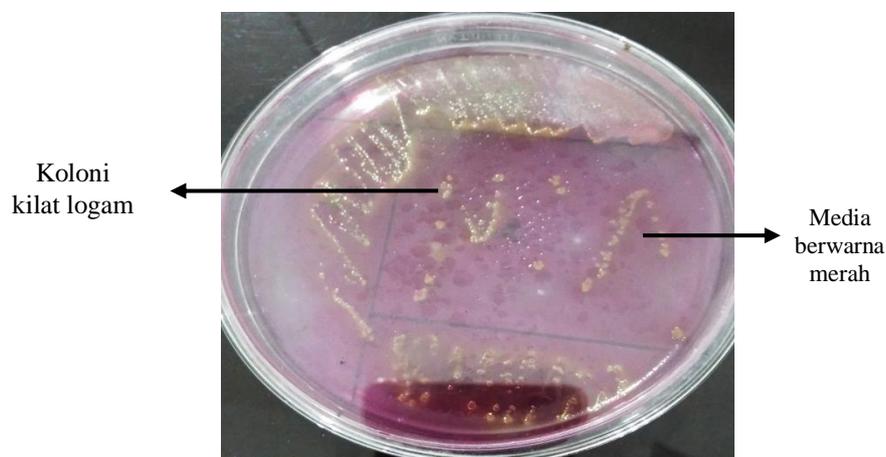
Keterangan :
 A : Ekstrak daun binahong
 B : Ekstrak daun talas
 (+) : positif mengandung golongan senyawa
 (-) : negatif, tidak mengandung golongan senyawa

Hasil identifikasi kandungan kimia yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak daun binahong dan daun talas mengandung senyawa flavonoid,

saponin, tanin, terpenoid, dan alkaloid. Gambar hasil identifikasi senyawa ekstrak daun binahong dan daun talas dapat dilihat pada lampiran 5, dan penjelasan hasil dapat dilihat pada lampiran 18.

7. Hasil identifikasi bakteri uji

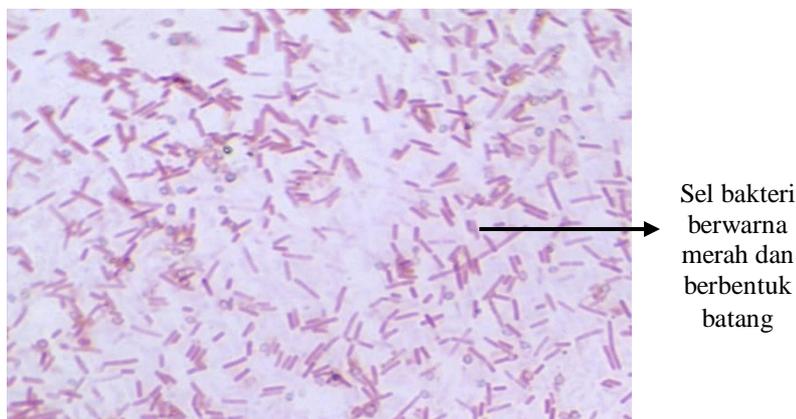
7.1 Hasil isolasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Isolasi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, suspensi *Escherichia coli* diinokulasikan pada media *Endo Agar* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil dinyatakan positif apabila terlihat koloni dengan kilat logam dan warna medium merah violet (Volk dan Wheller 1988). Media *Endo Agar* mengandung laktosa, warna merah pada media disebabkan karena bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 mampu memfregmentasi laktosa menjadi aldehid dan asam. Aldehid akan memecah antara ikatan natrium sulfit dengan fuchsin (cat). Koloni kilat logam disebabkan *Escherichia coli* ATCC 25922 bereaksi dengan fuchsin kristal sehingga fuchsin diserap. Gambar hasil isolasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dapat dilihat pada gambar 5 dan lampiran 6.



Gambar 5. Hasil identifikasi koloni *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media *Endo Agar*

7.2 Hasil identifikasi morfologi dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 merupakan bakteri Gram negatif ditandai dengan sel bakteri yang berwarna merah dan berbentuk batang. Prinsip dari pewarnaan Gram khususnya pada bakteri Gram negatif adalah bakteri tersebut akan berikatan dengan pewarna akhir yang diberikan pada pengujian. Pewarnaan Gram dilakukan dengan membuat ulasan

(smear) yang difiksasi kemudian ditetesi kristal violet (Gram A) menyebabkan kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri. Penetesan mordant (lugol's iodine/Gram B) menyebabkan adanya ikatan kristal violet dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Penetesan Gram C (alkohol) menyebabkan pori-pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks kristal violet tidak menempel di dinding sel (luntur), menyebabkan Gram negatif menjadi bening. Penetesan safarin (Gram D) akan mewarnai sel Gram negatif menjadi warna merah (Volk dan Wheller 1988). Gambar hasil identifikasi morfologi dengan pewarnaan Gram dapat dilihat pada gambar 6 dan lampiran 6.



Gambar 6. Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram

7.3 Hasil identifikasi fisiologi dengan uji biokimia. Bakteri ditanam dalam media *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Klinger Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Simmon Citrat* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada tabel 7 dan foto hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 7. Hasil identifikasi biokimia pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

| Pengujian | Hasil | Pustaka | Interpretasi data |
|-----------|-----------|-----------|-------------------|
| SIM | +++ | +++ | Sesuai |
| KIA | A/AG S(-) | A/AG S(-) | Sesuai |
| LIA | K/K S(-) | K/K S(-) | Sesuai |
| Citrat | - | - | Sesuai |

Keterangan

SIM : *Sulfide Indol Motility*
 KIA : *Klinger Iron Agar*
 LIA : *Lysine Iron Agar*

(+) : Reaksi positif
 (-) : Reaksi negatif
 A : Acid (kuning)

K : Alkali (merah atau ungu)
 S : Sulfida (hitam)
 G : Gas

Identifikasi pada media SIM (*Sulfida Indol Motility*) dilakukan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pengujian bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media SIM menunjukkan hasil (-++). Sulfida negatif artinya bakteri tersebut tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide yang ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media. Indol positif, setelah dilakukan penambahan *Erlich A* dan *B* terbentuk warna merah muda pada permukaan yang artinya bakteri *Escherichia coli* membentuk indol dari tryptophan sebagai sumber karbon. Tryptophan merupakan suatu asam amino esensial yang dapat mengalami reaksi oksidasi dalam kegiatan enzimatik bakteri. Uji motilitas positif menunjukkan ada pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, artinya bakteri tersebut memiliki flagel yang ditunjukkan dengan adanya penyebaran yang berwarna putih seperti akar disekitar inokulasi pada media SIM.

Identifikasi pada medium KIA (*Klinger's Iron Agar*) dilakukan untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas, dan pembentukan sulfida. Medium KIA mengandung laktosa 1% dan glukosa 1% dan fenol merah sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam. Medium KIA juga mengandung sodium thiosulfat yaitu substrat untuk menghasilkan H₂S. Pengujian bakteri *Escherichia coli* ATCC25922 pada media KIA menunjukkan hasil A/AGS(-). A/A (asam/asam) pada lereng dan dasar media berwarna kuning artinya bakteri tersebut memfermentasi glukosa dan laktosa karena bakteri tersebut mengubah indikator fenol merah menjadi kuning. G positif artinya terbentuknya gas yang ditandai dengan terangkat atau pecahan pada media. Sulfida negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media berarti bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino methion yang akan menghasilkan H₂S dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media.

Identifikasi pada medium LIA (*Lysin Iron Agar*) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Pengujian bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media LIA menunjukkan hasil K/KS(-). K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi

mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu), S negatif artinya uji H₂S negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media (Volk dan Wheeler 1988).

Identifikasi pada medium *Simmons Citrate* untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media *Simmons Citrate* menunjukkan hasil negatif. Warna media tidak berubah atau tetap hijau, menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Medium *Simmons Citrate* terdapat indikator BTB (*bromo thymol blue*) yang merupakan indikator pH, jika mikroba mampu menggunakan sitrat menyebabkan suasana basa dan asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru.

Berdasarkan hasil identifikasi bakteri secara biokimia dapat disimpulkan bahwa benar bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli*. Hasil identifikasi bakteri secara biokimia dapat dilihat pada lampiran 6.

8. Hasil pembuatan suspensi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922

Pengambilan suspensi dilakukan dengan mengambil biakan murni kurang lebih 2 ose bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Suspensi tersebut dimasukan ke dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan ditambahkan NaCl fisiologis sampai kekeruhannya sama dengan *McFarland* 0,5 yaitu setara dengan 10⁸ CFU/ml bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Tujuan distandarkannya dengan *McFarland* 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan selama penelitian sama dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

9. Hasil uji pendahuluan aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, atau 3:1, terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara difusi

Uji pendahuluan antibakteri ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) serta kombinasi

keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, atau 3:1 terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dilakukan dengan metode difusi. Tujuan dilakukan uji pendahuluan dengan metode difusi yaitu untuk melihat terbentuk atau tidaknya daerah jernih disekitar sumuran pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA), hal tersebut dianggap sebagai ukuran hambatan larutan uji terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 untuk kemudian dibandingkan diameter daerah hambat antara kombinasi ekstrak dengan variasi 1:1, 1:3, dan 3:1. Masing-masing ekstrak dibuat dalam konsentrasi yang sama yaitu 50% ekstrak dalam pelarut DMSO 1%. Variasi kombinasi ekstrak yang memiliki diameter daerah hambat paling besar, akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara dilusi bersama dengan ekstrak tunggal daun binahong dan daun talas. Hasil metode difusi dapat dilihat pada tabel 8 dan gambar hasil uji dapat dilihat pada lampiran 7.

Tabel 8. Hasil uji pendahuluan aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:1, 1:3, atau 3:1, terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara difusi

| Bahan uji | Diameter daerah hambat (mm) | | | Rata-rata ± SD |
|---------------|-----------------------------|-------|-------|----------------|
| | Replikasi | | | |
| | 1 | 2 | 3 | |
| Kontrol (-) | 0 | 0 | 0 | 0±0 |
| Binahong | 21,25 | 22,00 | 21,25 | 21,50±0,43* |
| Talas | 10,50 | 10,75 | 10,50 | 10,58±0,14* |
| Kombinasi 1:1 | 17,00 | 17,25 | 17,25 | 17,17±0,14* |
| Kombinasi 1:3 | 11,00 | 11,75 | 11,50 | 11,42±0,38* |
| Kombinasi 3:1 | 25,50 | 26,00 | 25,75 | 25,75±0,25* |

Keterangan

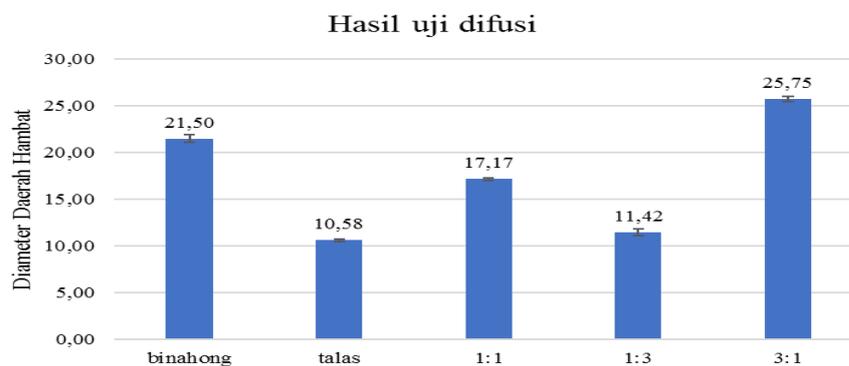
Kontrol (-) : DMSO 1%

Tanda * : berbeda signifikan dengan masing-masing ekstrak

Berdasarkan hasil uji pendahuluan yang telah dilakukan mengenai aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menunjukkan bahwa adanya aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya daerah hambat disekitar sumuran. Kemampuan masing-masing ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diketahui dengan mengukur diameter daerah hambat yang terlihat disekitar sumuran. Kemampuan ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dikarenakan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid,

saponin, tanin, alkaloid, dan terpenoid (Khairany *et al.* 2015; Sutrisno *et al.* 2014; Khunaifi 2010 dalam Rimpok *et al.* 2015). Hasil yang tertera pada tabel menunjukkan terdapat perbedaan baik antara masing-masing sampel uji maupun sampel uji dengan kontrol negatif. DMSO 1% yang digunakan sebagai pelarut dan kontrol negatif menunjukkan tidak adanya zona hambat yang menunjukkan bahwa kontrol yang digunakan tidak menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Menurut Fadlila *et al.* (2015) DMSO merupakan salah satu pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik polar maupun non polar, serta tidak memberikan daya hambat pertumbuhan bakteri sehingga tidak mengganggu hasil pengamatan pengujian aktivitas antibakteri.

Hasil pengujian didapat rata-rata diameter daerah hambat pada ekstrak tunggal daun binahong, ekstrak tunggal daun talas, ekstrak kombinasi 1:1, 1:3, dan 3:1 secara berturut-turut adalah 21,50 mm; 10,58 mm; 17,17 mm; 11,42 mm; 25,75 mm. Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri menurut Greenwood dalam Fitri (2013) adalah sebagai berikut: diameter zona hambat >20 mm berarti respon hambatan pertumbuhan sangat kuat, diameter zona hambat 10-20 mm berarti respon hambatan pertumbuhan kuat, diameter zona hambat 5-10 mm berarti respon hambatan pertumbuhan sedang, dan diameter zona hambat ≤ 5 mm berarti respon hambatan pertumbuhan lemah. Berdasarkan kriteria tersebut maka daya antibakteri ekstrak tunggal daun binahong dan kombinasi 3:1 termasuk sangat kuat, sedangkan ekstrak tunggal daun talas, kombinasi 1:1, dan 1:3 termasuk kuat. Ukuran diameter daerah hambat tergantung kepada kecepatan difusi antimikroba, derajat sensitifitas mikroorganisme, dan kecepatan pertumbuhan bakteri (Soleha 2015).



Gambar 7. Diagram batang hasil uji aktivitas antibakteri daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi 1:1, 1:3, dan 3:1 terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara difusi

Pada gambar 7 menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri paling efektif dilihat dari diameter daerah hambat yang dihasilkan berturut-turut adalah ekstrak kombinasi 3:1, ekstrak tunggal daun binahong, ekstrak kombinasi 1:1, ekstrak kombinasi 1:3, dan ekstrak tunggal daun talas.

Kombinasi 1:1 jumlah daun binahong dan daun talas dikombinasikan dalam jumlah yang sama. Kombinasi 1:3 terdiri dari satu bagian daun binahong dan tiga bagian daun talas. Perbandingan daun binahong dan daun talas 1:1 dan 1:3 diduga menyebabkan penurunan aktivitas antibakteri daun binahong dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Hal ini ditunjukkan dengan diameter daerah hambat ekstrak kombinasi 1:1 dan 1:3 lebih kecil dibanding dengan ekstrak tunggal daun binahong. Aktivitas antibakteri pada kombinasi 1:1 dan 1:3 diduga karena dipengaruhi oleh jumlah bagian serbuk yang kombinasi atau adanya interaksi antar senyawa. Belum diketahui secara pasti jenis senyawa yang terkandung di dalam daun binahong dan daun talas pada perbandingan 1:1 dan 1:3 yang dapat saling berinteraksi sehingga aktivitas antibakteri yang dihasilkan lebih rendah dibanding ekstrak tunggal daun binahong.

Kombinasi 3:1 terdiri dari tiga bagian daun binahong dan satu bagian daun talas. Perbandingan daun binahong dan daun talas 3:1 terjadi peningkatan aktivitas ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dibanding dengan ekstrak daun binahong dan daun talas dalam bentuk tunggal. Hasil menunjukkan jumlah daun binahong yang lebih banyak dapat meningkatkan

aktivitas dari ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Kemampuan hambatan yang dihasilkan oleh ekstrak daun binahong diduga karena adanya kandungan senyawa flavonoid golongan auron dalam daun binahong yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri bakteri *Escherichia coli* (Veronita *et al.* 2017). Mekanisme kerja dari flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri salah satunya adalah menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom (Yunikawati 2013).

Kandungan senyawa kimia lain dari ekstrak daun binahong dan daun talas adalah senyawa tanin yang dapat berperan sebagai antibakteri karena sifatnya yang dapat menginaktivasi enzim, bereaksi dengan membran sel, inaktivasi fungsi materi genetik yang berada pada sel bakteri. Bakteri Gram negatif terdapat sisi hidrofilik yaitu gugus karboksil, amino, fosfat, dan hidroksil yang peka terhadap senyawa polar sehingga tanin yang lebih bersifat polar dapat lebih mudah menembus dinding sel bakteri Gram negatif. Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri (Sulastrianah *et al.* 2014). Menurut Mardiana (2013) dalam Virgianti dan Purwati (2015) mekanisme saponin sebagai antibakteri dengan cara mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteri lisis. Menurut Kurniawan dan Aryana (2015) mekanisme alkaloid sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut.

Hasil analisis statistik data diameter daerah hambat (luas) ekstrak terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dapat dinyatakan terdistribusi normal atau mewakili populasi dengan nilai signifikansi ($0,456 > 0,05$) dan homogen dengan nilai signifikansi ($0,171 > 0,05$). Hasil uji *One Way* ANOVA terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi ($0,00 < 0,05$) dilanjutkan dengan uji LSD. Hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antar masing-masing ekstrak. Dari tabel *Descriptives* dapat dilihat nilai *mean* dari masing-masing

ekstrak. Nilai *mean* tertinggi ada pada ekstrak 3:1 dengan nilai *mean* 25,75 mm yang menunjukkan bahwa ekstrak kombinasi 3:1 memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dibanding dengan ekstrak tunggal daun binahong, ekstrak tunggal daun talas, ekstrak kombinasi 1:1, dan ekstrak kombinasi 1:3 dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Hasil statistik dapat dilihat pada lampiran 16.

10. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 3:1 terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 3:1 terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dilakukan dengan metode dilusi. Pengujian dengan metode dilusi atau dengan menggunakan seri pengenceran pada larutan uji bertujuan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu konsentrasi terendah dari suatu antimikroba dalam menghambat pertumbuhan antibakteri dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yaitu konsentrasi terendah dari suatu antimikroba yang mampu membunuh bakteri. Perhitungan konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 15.

Pengujian aktivitas ekstrak antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan seri konsentrasi pengenceran 33,33%; 16,66%; 8,33%; 4,16%; 2,08%; 1,04%; 0,52%; 0,26%; 0,13%; 0,06%. Kontrol negatif yang digunakan yaitu ekstrak dan kontrol positif yaitu bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Suspensi bakteri yang digunakan diencerkan dalam medium BHI. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilihat dari kejernihan pada tabung yang menunjukkan bahwa pada tabung konsentrasi tertentu masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil yang didapatkan tidak dapat dilihat karena tertutupi oleh kekeruhan yang berasal dari ekstrak yang berwarna hijau sehingga mempersulit pengamatan. Hal tersebut dapat diatasi dengan melakukan inokulasi pada semua tabung dalam cawan petri pada media *Endo Agar* sehingga diketahui ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri.

Inokulasi pada media *Endo Agar* pada seri konsentrasi 33,33%; 16,66%; 8,33%; 4,16%; 2,08%; 1,04%; 0,52%; 0,26%; 0,13%; 0,06%; dan kontrol positif menunjukkan hasil positif jika media berwarna merah dan adanya kilat logam yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabel 9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 3:1 terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara dilusi

| Konsentrasi | Hasil Inokulasi | | | | | | | | |
|-------------|-----------------------|----|-----|--------------------|----|-----|-----------------------|----|-----|
| | Ekstrak daun binahong | | | Ekstrak daun talas | | | Ekstrak kombinasi 3:1 | | |
| | I | II | III | I | II | III | I | II | III |
| K (-) | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 33,33% | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16,66% | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 8,33% | - | - | - | + | + | + | - | - | - |
| 4,16% | - | - | + | + | + | + | - | - | - |
| 2,08% | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| 1,04% | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 0,52% | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0,26% | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0,13% | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0,06% | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| K(+) | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Keterangan

(-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri pada media

(+) : Ada pertumbuhan bakteri pada media

K (-) : kontrol negatif (ekstrak)

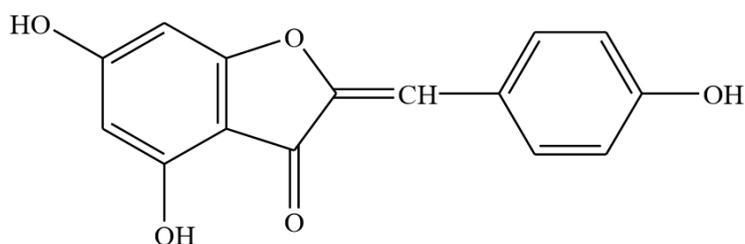
K (+) : kontrol positif (suspensi bakteri)

Hasil inokulasi pada tabel 9 menunjukkan nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari masing-masing ekstrak. Inokulasi ekstrak daun binahong pada konsentrasi 33,33%, 16,66%, 8,33%, dan 4,16%, daun talas pada konsentrasi 33,33% dan 16,66%, kombinasi 3:1 pada konsentrasi 33,33%, 16,66%, 8,33%, 4,16%, dan 2,08% dalam media *Endo Agar* tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri. Nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak daun binahong, daun talas, dan kombinasi 3:1 berturut-turut adalah 4,16%, 16,66%, dan 2,08%. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak kombinasi 3:1 memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dengan nilai KBM 2,08%. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) merupakan kadar terendah dari antimikroba yang dapat membunuh bakteri ditandai dengan tidak tumbuhnya kuman pada medium padat (Nuraina 2015).

Ekstrak kombinasi 3:1 memiliki efektivitas yang lebih baik karena terjadi peningkatan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922

dibanding dengan ekstrak daun binahong dan daun talas dalam bentuk tunggal. Ekstrak tunggal daun binahong memiliki nilai KBM 4,16% dan pada ekstrak tunggal daun talas memiliki nilai KBM 16,66%, setelah dikombinasikan dengan perbandingan tiga bagian daun binahong dan satu bagian daun talas terjadi peningkatan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan nilai KBM 2,08%. Peningkatan aktivitas antibakteri dari ekstrak kombinasi 3:1 diduga karena kandungan bahan aktif yang berpotensi sebagai antibakteri saling memperkuat khasiatnya sehingga lebih efektif dibanding ekstrak tunggal daun binahong dan ekstrak tunggal daun talas.

Kemampuan aktivitas antibakteri dari daun binahong diduga karena adanya kandungan senyawa flavonoid golongan auron yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 (Veronita *et al.* 2017).



Gambar 8. Struktur Auron
Sumber: Veronita *et al.* 2017

Senyawa pada tanaman talas yang diduga memiliki aktivitas antibakteri salah satunya adalah flavonoid (Fadlila *et al.* 2015). Senyawa fenolik yang terkandung dalam tanaman talas diantaranya asam fenolik, flavon mono-C-glikosida, flavon di-C-glikosida, flavon mono-C-(O-glikosil) glikosida, flavon di-C-(O-glikosil) glikosida, flavon-O-glikosida, dan luteolin-6-C-heksosida (Ferrerres *et al.* 2012). Menurut Sansetyawati (2015) ion H^+ dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipid akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat, dan asam fosfat. Hal tersebut akan menyebabkan fosfolipid tidak mampu mempertahankan bentuk membran sel, akibatnya membran akan bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan bahkan bakteri akan mati.

Hasil analisis statistik data konsentrasi ekstrak daun binahong dan daun

talas serta kombinasi keduanya dengan variasi 3:1 terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dapat dinyatakan terdistribusi normal atau mewakili populasi dengan nilai signifikansi ($0,586 > 0,05$). Data tidak homogen dengan nilai signifikansi ($0,01 < 0,05$) karena salah satu syarat untuk uji ANOVA tidak terpenuhi dilanjutkan *Nonparametric Test* dengan *Kruskal Wallis Test* menunjukkan nilai signifikansi ($0,025 < 0,05$) yaitu artinya terdapat perbedaan bermakna dari konsentrasi masing-masing ekstrak yaitu ekstrak daun binahong, ekstrak daun talas, ekstrak kombinasi 3:1 dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Hasil statistik dapat dilihat pada lampiran 17.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) dan daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) serta kombinasi keduanya memiliki aktivitas antibakteri. Kombinasi 3:1 memiliki aktivitas penghambatan paling efektif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 ditunjukkan dengan diameter daerah hambat sebesar 25,75 mm.

Kedua, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dari ekstrak tunggal daun binahong yaitu 4,16%, ekstrak tunggal daun talas yaitu 16,66%, dan kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 3:1 yaitu 2,08%. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak kombinasi 3:1 memiliki aktivitas antibakteri yang paling efektif dengan nilai KBM 2,08%.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas kombinasi ekstrak etanol daun binahong dan daun talas :

Pertama, untuk memperoleh aktivitas antibakteri yang paling efektif dengan cara membandingkan beberapa metode ekstraksi dan dengan bakteri lain.

Kedua, untuk mengetahui aktivitas antibakteri dengan metode difusi dari masing-masing nilai KBM yang diperoleh dari metode dilusi.

Ketiga, perlu dilakukan kajian mengenai senyawa yang berperan sebagai antibakteri dalam ekstrak daun binahong dan daun talas yang dapat saling berinteraksi jika dikombinasikan.

Keempat, perlu dilakukan uji *checkerboard* untuk mengetahui aktivitas antibakteri sinergis atau antagonis.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainurrochmah A., Ratnasari E., Lisdiana L. 2013. Efektivitas Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap Penghambatan Pertumbuhan Bakteri *Shigella flexneri* dengan Metode Sumuran. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam: Universitas Negeri Surabaya. LenteraBio 2(3).
- Akhyar. 2010. Uji Daya Hambat dan Analisis KLT Bioautografi Ekstrak Akar dan buah bakau (*Rhizophora stylosa griff*) Terhadap *Vibrio Harveyi* [Jurnal Ilmiah]. Makasar: Universitas Hasanuddin
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., Iwatsuki, T. 2001. *Antibacterial Action of Several Tannins Against Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Volume 48 : 487- 491.
- Alamsyah HK, Widowati I, Sabdono A. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Sargassum cinereum* (J.G. Agardh) Dari Perairan Pulau Panjang Jepara Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermidis*. *Journal Of Marine Research* 3(2):69-78.
- Amanda N.F.R. 2015. Perbandingan Ekstrak Daun Binahong dan Ekstrak Daun Cengkeh dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* [Naskah Publikasi]. Surakarta: Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Arisandi L.J. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol, Fraksi n-heksana, Etil Asetat dan Air dari Daun Talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Aswarita R. 2013. Interaksi Ekstrak Daun Lidah Buaya (*Aloe vera* L.) dan Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Terhadap Daya Hambat *Escherichia coli* Secara *In Vitro*. Aceh : Pendidikan Biologi, Unsyiah, Banda Aceh. *Jurnal EduBio Tropika* 1(2) Edisi Khusus, Desember 2013, hlm. 61-1201(2).
- Ayu D.P. 2013. Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Jambu Monyet (*Anacardium occidentale* L.) dan Vankomisin Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* [Naskah Publikasi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [BPOM RI] Direktorat Obat Asli Indonesia. 2008. *Taksonomi Koleksi Tanaman Obat Kebun Tanaman Obat Citeureup*. Jakarta: BPOM RI. Hlm 10
- [BPOM RI]. 2005. *InfoPom*. Jakarta: Badan Pengawasan Obat dan Makanan RI 6(4), ISSN 1829-9334

- Badan Standardisasi Nasional. 2009. *Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam pangan*. SNI:7388
- Berg, Howard C. 2004. *E. coli in Motion, Biological, and Medical Physics Biomedical Engineering*. New York: Springer Verlag AIP Press.
- Biren NS, BS Nayak, SP Bhatt, SS Jalalpure, AK Seth. 2007. *The Anti-Inflamantory of The Leaves of Colocasia esculenta*. *Saudi Pharmaceutical Journal* 15:228-232
- Bridson E. Y. 1998. *The Oxoid Manual 8th Edition*. Oxoid Limited Hampsire: England
- Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 2005. *Mikrobiologi kedokteran*. Alih Bahasa.
- Carter, G., D.J. Wise. 2004. *Esentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. Iowa Atate Press. 137-139.
- Ceshnie T., Lamb A.J., 2005. *Antimicrobial activity of flavonoids*. *International Journal of Antimi-crobial Agents* 26. 343-356
- [DepKes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1987. *Analisis Obat Tradisional*. Jilid 1. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- [DepKes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- [DepKes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia . 1995. *Materia Medika Indonesia*. Jakarta: Departemen kesehatan Indonesia
- [DepKes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standart Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan I. Dirjen Pengawas Obat Dan Makanan. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 10-19
- [Dirjen POM Departemen Kesehatan Indonesia]. 1995. *Farmakope Indonesia edisi keempat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Darmadi. 2008. *Infeksi Nosokomial: Problematika dan Pengendaliannya*. Jakarta: Salemba Medika
- Deby A.Mpila I, Fatimawali, Weny I. Wiyono. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*Coleus atropurpureus* [L] benth) terhadap *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* secara *in-vitro*. Manado: Program Studi Farmasi FMIPA, UNSRAT.
- Fadlila W.N., Yuliawati K.M., Syafnir L. (2015). Identifikasi Senyawa Aktif Antibakteri Dengan Motode Bioautografi KLT terhadap Ekstrak Etanol

Tangkai Daun Talas (*Colocasia Esculenta* (L.) Schott). Fakultas MIPA: Unisba. ISSN 2460-6472.

- Ferreres F., Goncalves R.F., Gil-Izquierdo A., Valantao P., Silva A.M.A., Silva J.B., Santos D., and Andrade P.B. (2012). *Further knowledge on the phenolic profile of Colocasia esculenta* (L.) Schott [abstrak]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Fitri L. 2013. Kemampuan Daya Hambat Beberapa Macam Sabun Antiseptik Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam: Universitas Syiah Kuala.
- Fitriantari A.R. 2017. Kajian Aktivitas Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) dan Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis* Miller) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Goncalves RF, AMS Silva, AM Silva, P Valentao, F Ferreres, A Gil-Izquierdo, JB Silva, D Santos, PB Andrade. 2013. *Influence of Taro (Colocasia esculenta L. Shott) Growth Conditions On The Phenolic Composition and Biological Properties*. Elsevier: *Food Chemistry 141*. 3480-3485.
- Herbone, J.B. 1987. Metode Fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan, diterjemahkan oleh Padmawinata, K. Bandung: ITB
- Hidayati I. W. 2009. Uji Aktifitas Salep Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steen) sebagai Penyembuh Luka Bakar pada Kulit Punggung Kelinci. [Skripsi]. Fakultas Farmasi : Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Jawetz, Melnick, J.L., and Adelberg, E.A. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi I. Jakarta: Salemba Medika
- Jawetz, Melnick, J.L., and Adelberg, E.A. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Maulany, R. F., dan Edinugroho, Jakarta, Salemba Medika.
- Jawetz, Melnick, J.L., and Adelberg, E.A. 2007. *Medical Microbiologi 24th edition*. USA: Mc-Graw Hill companies.
- Jayaraman, P., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., Tang, T. H., & Sakharkar, K.R. 2010. *Activity and Interaction of Antibiotic and Phytochemical Combination Against Pseudomonas aeruginosa*, *International Journal of Biological Sciences*, 6 (6): 556-568.

- [Kemenkes RI] Kementeri Kesehatan Republik Indonesia. 2016. *Propil Kesehatan Indonesia Tahun 2015*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 317-27
- Karlina C.Y., Ibrahim M., dan Trimulyono G. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Herba Krokot (*Portulaca oleracea* L) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Elektronic Journal UNESA Lantera Bio*, 2(1): 87-93
- Katno., Pramono S., Agus S. 2008. *Tingkat Manfaat, Keamanan, Dan Efektifitas Tanaman Obat Dan Obat Tradisional*. Jawa Tengah: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan.
- Khairany N., Idiawati I., Wibowo M.A. 2015. Analisis Sifat Fisik dan Kimia Gel Ekstrak Etanol Daun Talas (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). *JKK Volume 4(2)*: 81-88
- Koawara, Sutrisno. 2013. *Teknologi Pengolahan Umbi-umbian. Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology (SEAFAST) Center Research and Community Service Insritution*. IPB
- Kurniawan B., dan Aryana W.F. 2015. Binahong (*Cassia Alata* L) For Inhibiting The Growth Of Bacteria *Escherichia coli*. *J Majority 4(4)*. Hlm 100-104
- Lullman H., Mohr K., Ziegler A., and Bieger D. 2000. *Color atlas of pharmacology 2nd edition*. USA: Thieme
- Marliana S.D., Suryanti V., Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi 3 (1)*: 26-31
- Meila Okpri. 2016. *Analysis of the relationship a treatment duration of antibiotic usage in pediatric patient of diarrhea at RSUP Persahabatan. Social Clinical Pharmacy Indonesia Journal 1(1)* : 21-30.
- Melliawati R. 2009. *Escherichia coli* dalam kehidupan manusia. *BioTrends 4(1)*: 10-14
- Michael, J. Pelezar, Jr., E.C.S. Chan. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia
- Nuraina. 2015. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun *Garcinia benthami* Pierre dengan Metode Dilusi [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Paramesti N.N. 2014. Efektivitas Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya* L) sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri *Escherichia coli* [Skripsi]. Jakarta:Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Syarif

Hidayatullah.

- Pink A. 2004. *Gardening for the million*. Melbourne: Project Gutenberg Literary Achive Foundation. pp 1.
- Pink A. 2008. *Profile for Anredera cordifolia Ten. (heartleaf madeirvine) Gardening for the million*. United States: Project Gutenberg Inc.
- Prajapati, Rakesh. 2011. *Colocacia esculenta: A Potent Indigenoues Plant International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases* 2(1) : 90-96.
- Prasetyo W. 2015. Perbedaan Daya Hambat Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan Bakteri *Shigella dysenteriae* serta Pemanfaatannya sebagai Karya Ilmiah Popular [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember.
- Pratiwi K.I. 2016. Pengaruh Penambahan Konsentrasi Tepung Daun Talas (*Colocasia esculenta*) dalam Pakan terhadap Berat Ikan Lele Jumbo (*Clarias glariefpinus*) [Skripsi]. Pasundan: Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan, Universitas Pasundan.
- Pratiwi S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga Medical Series.
- Radji M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Ratnasari. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Diklorometan dan Etil Asetat Daun Mimba (*Azadiracnta indica A. Juss*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* [Skripsi]. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah
- Rimporok S., Kepel B.J., dan Siagian K.V. 2015. Uji Efektivitas Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia Steenis*) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* Secara In Vitro. Fakultas kedokteran: UNSRAT.
- Sansetyawati M.S. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tanaman Yodium (*Jatropha multifida L.*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Escherichia coli* ATCC 11229 secara *IN VITRO* [Naskah Publikasi]. Fakultas Kedokteran: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Sari R.M. 2011. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia (Ten.) Steenis*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro* [Skripsi]. Jember: Fakultas Kedokteran, Universitas Jember.
- Siadi K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai

- Biopestisida Yang Efektif Dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA* 35(2): 77-83
- Soleha T.U. 2015. Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik. Fakultas Kedokteran: Universitas Lampung.
- Songer J.G., Post K.W. 2005. *Veterinary Microbiology. Bacterial and Fungal Agent of Animal Disease*. USA: Elsevier Saunders.
- Sudoyo A.W., Setiyohadi B., Alwi I., Simadibrata K.M., Setiati S., editor. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi ke-8. Jakarta: InternaPublising. hlm 548-555.
- Sulastrianah, Imran, Fitria E.S. 2014. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak (*annona muricata* L.) dan Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. Program Pendidikan Dokter FK UHO.
- Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Papas Sinar Sinanti
- Sutrisno E., Adnyana I.K., Sukandar E.Y., Fidrianny I. dan Lestari. 2014. Kajian Aktivitas Penyembuhan Luka Dan Antibakteri Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) serta Kombinasinya Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* Dari Pasien Luka Kaki Diabetes. Bandung: Farmasi, Institut Teknologi Bandung.
- Svehla.1990. Vogel *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro Dan Semimikro*. Jakarta:PT.Kalman media pustaka
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. 2011. Phytochemical screening and Extraction. *Internationale Pharmaceutica Scientia*.
- Tjay T.H., dan Rahardja K. 2006. *Obat-Obat Penting Khasiat Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya* edisi ke enam. Jakarta: PT.Elex Media Komputindo.
- Tshikalage, T.E *et al.* 2004. *Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of bioactive compound from plants used to treat sexually transmited diseases. Journal of Ethnopharmacologi*. University Of Pretoria: Journal of Ethnopharmacologi.
- Umar A., *et al.* 2012. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cardifolia* (Ten) Steenis) terhadap Kesembuhan Luka Infeksi *Staphylococcus aureus* pada Mencit. *Jurnal analisis kesehatan sains* 1(2) : 1-8
- Veronita F., Wijayati N., dan Mursiti S. 2017. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Daun Binahong serta Aplikasinya sebagai Hand Sanitizer. Fakultas

Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam: Universitas Negeri Semarang.
Indonesian Journal of Chemical Science 6 (2).

Virgianti D.P. dan Purwati D. M. (2015). Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus pyogenes* secara in vitro. Tasikmalaya: Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada 13(1)

Volk dan Wheeler. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi Kelima. Jilid 1. Jakarta: Penerbit Erlangga

Wei L.S., W Wee, JYF Siong, DF Syamsumir. 2011. *Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer Property and Chemical Composition of Different Parts (Corm, Stem and Leave) of Colocasia esculenta Extract*. *Annales Universitatis Mariae Curie – Sklodowska Lublin – Polonia*. XXIV (23). 9-16.

Wulandari I. 2011. Teknologi Ekstraksi dengan Metode Maserasi dalam Etanol 70% pada Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus Benth*) di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) Tawamangmangu [Skripsi]. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.

Yuniarti, T. (2008). *Ensiklopedia Tanaman Obat Tradisional*. Yogyakarta: Media presindo.

Yunikawati M.P.A., Besung I.N.K., Mahatmi H. 2013. Efektifitas Perasan Daun Srikaya Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli*. *Indonesia Medicus Veterinus* 2013 2(2) : 170-179.

Zahro L. dan Agustini R. 2013. Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Saponin Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*) TERHADAP *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *UNESA Journal of Chemistry* 2(3)

*L
A
M
P
I
R
A
N*

Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis)



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

Nama Pemesan : Risky Herdina Putri
NIM : 20144074A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

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

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

1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31b-403b-404b-405b-414a-415b-451b-466b-467b-468b-469b-470e-541a _____ **49. Basellaceae**
1b _____ **2. Anredera**
1 _____ **Anredera cordifolia (Ten.) Steenis**

Deskripsi Tumbuhan :

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

Surakarta, 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. Hasil determinasi tanaman daun talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott)



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 : 202/UN27.9.6.4/Lab/2017
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -
Nama Pemesan : Risky Herdina Putri
NIM : 20144074A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Colocasia esculenta* (L.) Schott
Familia : Araceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963, 1968) :

1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27b-799b-800b-801b-802a-803b-804b-805b **215. Araceae**
1b-2b-3b-5b-8a-9a-10a-11a-12b **21. Colocasia**
1a ***Colocasia esculenta* (L.) Schott**

Deskripsi Tumbuhan :

Habitus : terna, menahun, tegak, tinggi 0.4-1.5 m, bergetah iritatif, menghasilkan umbi di dalam tanah yang merupakan modifikasi dari batang. Umbi : umbi batang, bentuk bulat hingga bulat memanjang, diameter hingga mencapai 10 cm, coklat hingga coklat kekuningan, jelas memperlihatkan buku-buku tempat tumbuhnya tunas. Akar : serabut, muncul dari umbi, berwarna putih hingga kuning kotor atau coklat kekuningan. Daun : tunggal, bentuk bulat telur-segitiga atau ellips memanjang atau perisai, panjang 20-55 cm, lebar 11-36 cm, pangkal membulat, tepi bergelombang, ujung runcing hingga meruncing panjang, daging daun tipis, permukaan atas hijau dan licin, permukaan bawah hijau atau ungu dan berililil; tangkai daun bulat, berongga, hijau atau ungu atau hijau keunguan atau hijau kemerahan hingga hijau kekuningan, panjang 28-1.5 cm, pada bagian pangkal berpelelepah. Bunga : majemuk bentuk tongkol, berjumlah 2-3 tongkol, di ketiak daun, terdiri atas sekumpulan bunga berkelamin tunggal atau bunga mandul (steril), jumlah bunga banyak sekali, tanpa perhiasan bunga, duduk pada ibu tangkai bunga, sedikit panjang dari seludang bunga; ibu tangkai bunga hijau, gundul, panjang hingga 55 cm; seludang bunga memanjang, panjang 5.5-15 cm, lebar 4-8 cm; seludang bunga bagian bawah hijau, tetap tinggal dan menggulung berbentuk tabung, panjang 3-8 cm, lebar 1.75 cm; seludang bunga bagian atas lebih panjang, rontok, kuning jingga. Bunga betina : pada tongkol terletak di bagian bawah, panjangnya 4-8 cm, lebar 1 cm, hijau, semakin menyempit menuju ke ujung tongkol. Bunga mandul : terletak di bagian tengah tongkol, panjang 2-4.5 cm, diameter 3 mm, berwarna kuning mentega. Bunga jantan : berbentuk silindris, terletak pada bagian ujung tongkol, semakin menyempit pada bagian ujung tongkol, panjang 2-9.5 cm, diameter 8-15 mm, berwarna kuning mentega, kepala sari bersatu dalam kelompok. Buah : beri, memanjang, diameter 5 mm, berwarna hijau ketika muda tapi berubah menjadi jingga hingga merah ketika masak. Biji : kecil, hitam, beralur membujur.

Kepala Lab. Program Studi Biologi

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

Surakarta, 9 Oktober 2017
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 3. Foto tanaman, daun, serbuk, dan ekstrak daun binahong dan daun talas



Tanaman binahong



Daun binahong



Serbuk daun binahong



Tanaman talas



Daun talas



Serbuk daun talas



Ekstrak pekat



Larutan stok

Lampiran 4. Foto botol maserasi, *Rotary evaporator*, *Moisture balance*, *Oven*, *Incubator*, *Autoclave*



Botol maserasi



Moisture balance



Rotary evaporator



Oven



Incubator



Autoclave

Lampiran 5. Foto Identifikasi kandungan ekstrak daun binahong dan daun talas

A. Hasil identifikasi kandungan ekstrak daun binahong



Flavonoid pada ekstrak daun binahong (+)



Saponin pada ekstrak daun binahong (+)



Tanin pada ekstrak daun binahong (+)



Terpenoid pada ekstrak daun binahong (+)



Alkaloid pada ekstrak daun binahong (+)

B. Hasil identifikasi kandungan ekstrak daun talas

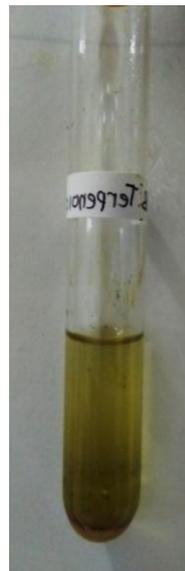
Flavonoid pada ekstrak daun talas (+)



Saponin pada ekstrak daun talas (+)



Tanin pada ekstrak daun talas (+)

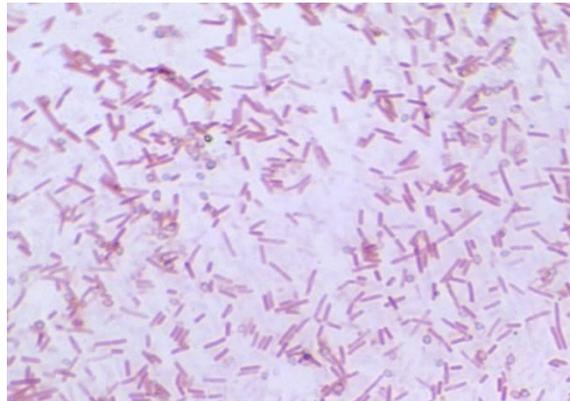


Terpenoid pada ekstrak daun talas (+)



Alkaloid pada ekstrak daun talas (+)

Lampiran 6. Foto hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922



Hasil identifikasi morfologi dengan pewarnaan Gram pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

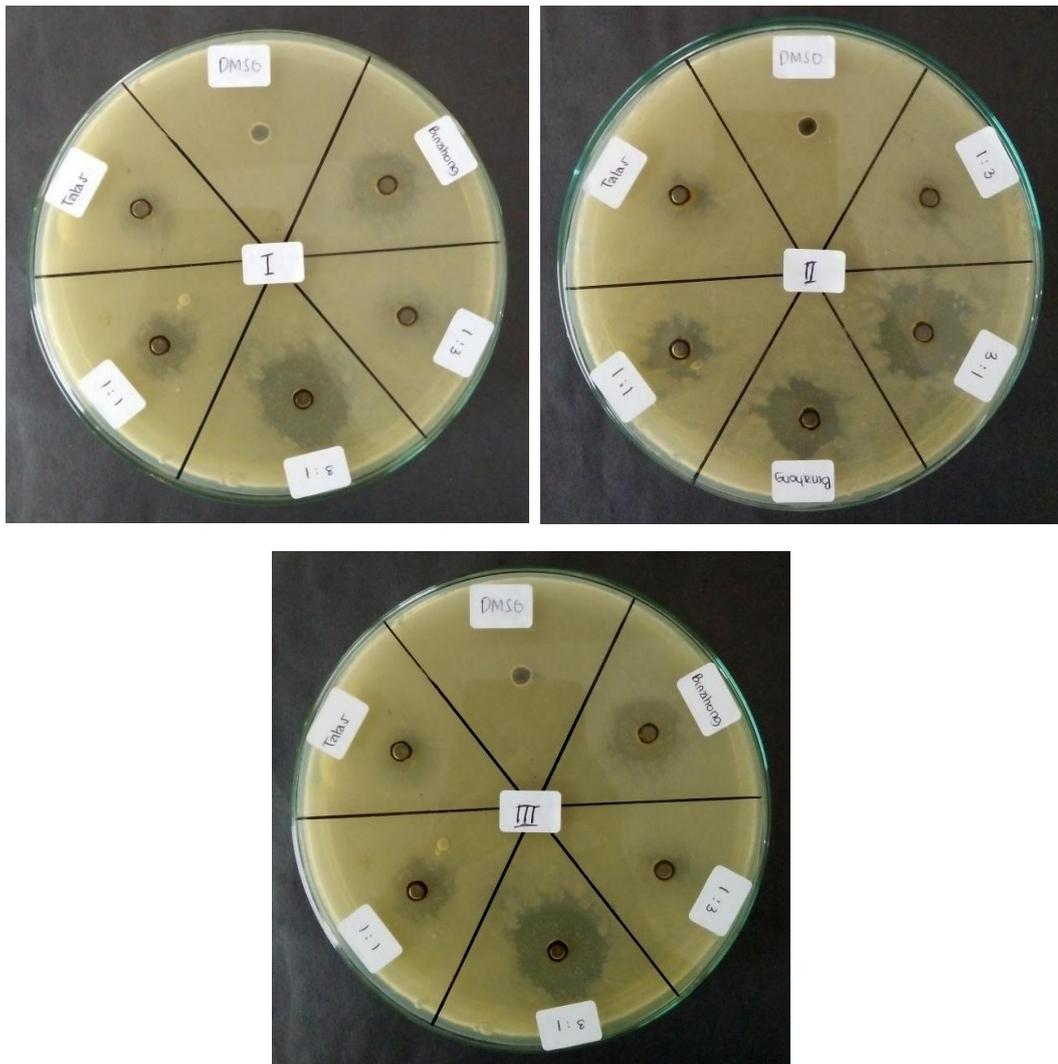


Hasil isolasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media *Endo Agar*



Hasil identifikasi biokimia pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Lampiran 7. Foto hasil uji pendahuluan aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi kombinasi 1:3 terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara difusi



Lampiran 8. Foto hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak uji terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara dilusi

- A. Foto hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong secara dilusi (3 kali replikasi)



Replikasi 1. Ekstrak daun binahong tunggal



Replikasi 2. Ekstrak daun binahong tunggal

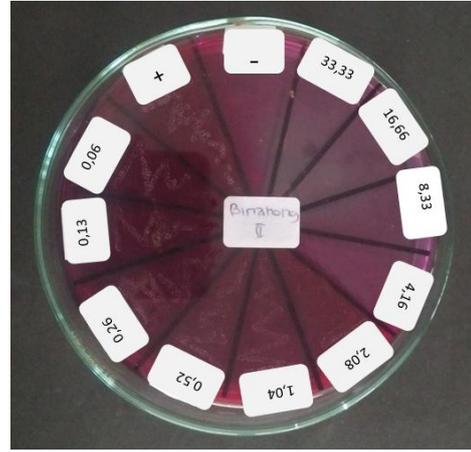


Replikasi 3. Ekstrak daun binahong tunggal

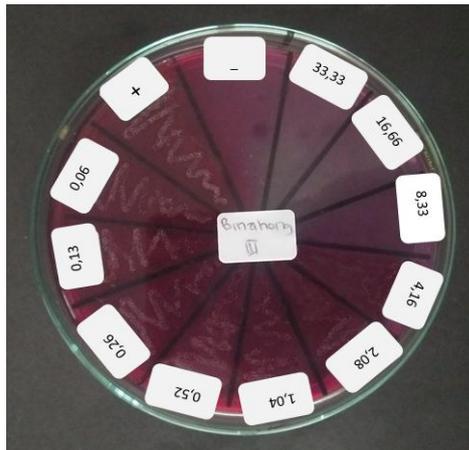
B. Foto hasil inokulasi uji dilusi ekstrak daun binahong pada media *Endo Agar* (3 kali replikasi)



Replikasi 1. ekstrak daun binahong tunggal KBM 4,16%



Replikasi 2. ekstrak daun binahong tunggal KBM 4,16%



Replikasi 3. ekstrak daun binahong tunggal KBM 8,33%

- A. Foto hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun talas secara dilusi (3 kali replikasi)



Replikasi 1. Ekstrak daun talas tunggal

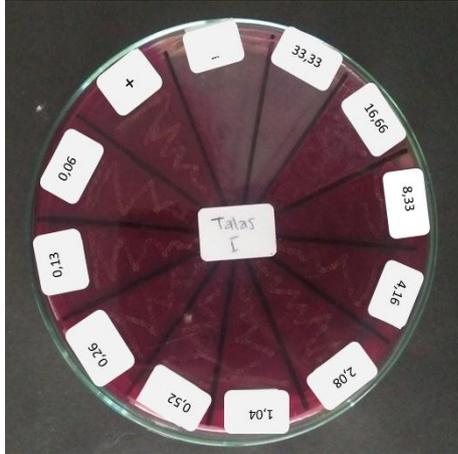


Replikasi 2. Ekstrak daun talas tunggal



Replikasi 3. Ekstrak daun talas tunggal

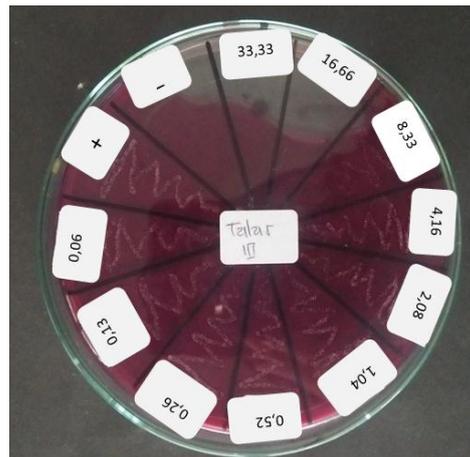
B. Foto hasil inokulasi uji dilusi ekstrak daun talas pada media *Endo Agar*



Replikasi 1. ekstrak daun talas tunggal
KBM 33,33%



Replikasi 2. ekstrak daun talas tunggal
KBM 16,66%



Replikasi 3. ekstrak daun talas tunggal
KBM 16,66%

- A. Foto hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi daun binahong dan daun talas dengan variasi kombinasi 3:1 secara dilusi (3 kali replikasi)



Replikasi 1. Ekstrak kombinasi 3:1

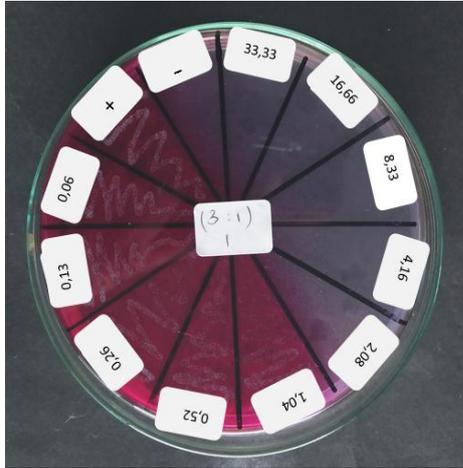


Replikasi 2. Ekstrak kombinasi 3:1

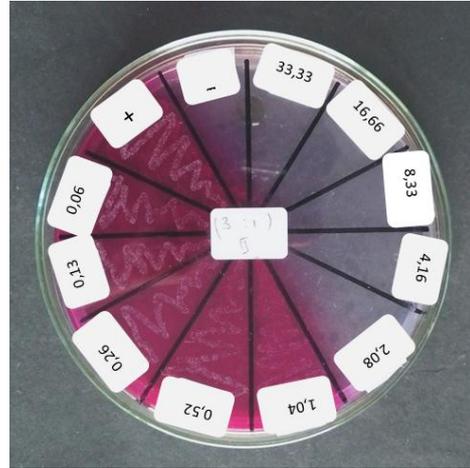


Replikasi 3. Ekstrak kombinasi 3:1

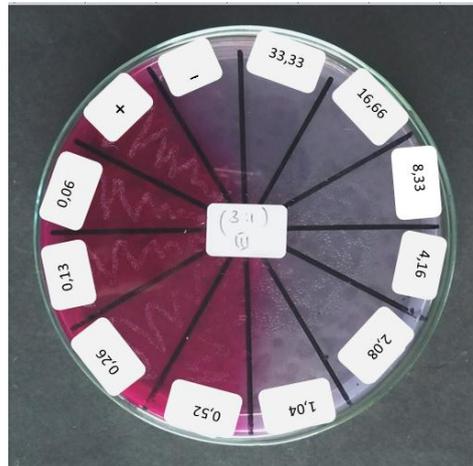
B. Foto hasil inokulasi uji dilusi ekstrak ekstrak kombinasi daun binahong dan daun talas dengan variasi kombinasi 3:1 pada media *Endo Agar*



Replikasi 1. ekstrak kombinasi 3:1
KBM 2,08%



Replikasi 2. ekstrak kombinasi 3:1
KBM 2,08%



Replikasi 3. ekstrak kombinasi 3:1
KBM 1,04%

**Lampiran 9. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basa
daun binahong dan daun talas**

| | Bobot basah (gram) | Bobot kering (gram) | Rendemen (b/b) |
|---------------|--------------------|---------------------|----------------|
| Daun binahong | 7.000,00 | 2.550,00 | 36,42% |
| Daun talas | 12.000,00 | 2.150,00 | 17,91% |

Perhitungan % rendemen bobot kering terhadap bobot basah :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobotkering (gram)}}{\text{bobot basah (gram)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen daun binahong} = \frac{2.550,00 \text{ gram}}{7.000,00 \text{ gram}} \times 100\% = 36,42\%$$

$$\% \text{ Rendemen daun talas} = \frac{2.150,00 \text{ gram}}{12.000,00 \text{ gram}} \times 100\% = 17,91\%$$

**Lampiran 10. Perhitungan penetapan susut pengeringan menggunakan alat
*moisture balance***

| | Bobot awal (gram) | Bobot akhir (gram) | Susut kering (%) |
|-----------------|-------------------|--------------------|------------------|
| Serbuk binahong | 2,000 | 1,830 | 8,30 |
| | 2,000 | 1,830 | 8,20 |
| | 2,000 | 1,830 | 8,30 |
| Rata-rata ± SD | | | 8,26% ± 0,05 |

Perhitungan rata-rata prosentase dengan 3 kali replikasi

$$\text{Serbuk daun binahong} = \frac{8,30\% + 8,20\% + 8,30\%}{3} = 8,26\%$$

| | Bobot awal (gram) | Bobot akhir (gram) | Susut kering (%) |
|----------------|-------------------|--------------------|------------------|
| Serbuk talas | 2,000 | 1,830 | 8,40 |
| | 2,000 | 1,830 | 8,40 |
| | 2,000 | 1,830 | 8,30 |
| Rata-rata ± SD | | | 8,36% ± 0,05 |

Perhitungan rata-rata prosentase dengan 3 kali replikasi

$$\text{Serbuk daun talas} = \frac{8,40\% + 8,40\% + 8,30\%}{3} = 8,36\%$$

Lampiran 11. Perhitungan pembuatan ekstrak kombinasi serbuk daun binahong dan daun talas dengan perbandingan 1:1, 1:3, dan 3:1.

Serbuk daun binahong tunggal = 500,00 gram

Serbuk daun talas tunggal = 500,00 gram

Kombinasi 1:1 = 250,00 gram serbuk daun binahong + 250,00 gram serbuk daun talas

Kombinasi 1:3 = 125,00 gram serbuk daun binahong + 375,00 gram serbuk daun talas

Kombinasi 3:1 = 375,00 gram serbuk daun binahong + 125,00 gram serbuk daun talas

Perhitungan pelarut etanol 96% yang digunakan untuk ekstraksi dengan perbandingan 10:75

Berat serbuk 500,00 gram = $\frac{500,00 \text{ gram}}{10,00 \text{ gram}} \times 75 \text{ ml} = 3.750 \text{ ml etanol 96\%}$

Lampiran 12. Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun binahong dan daun talas

| | Berat serbuk (gram) | Berat wadah kosong (gram) | Berat wadah + ekstrak (gram) | Berat ekstrak (gram) | Rendemen (b/b) |
|---------------|---------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------|-----------------|
| Daun binahong | 500,00 | 141,186 | 166,955 | 25,769 | 5,15 % |
| Daun talas | 500,00 | 178,705 | 203,602 | 24,896 | 4,98 % |
| Kombinasi 1:1 | 500,00 | 167,108 | 193,326 | 26,218 | 5,24 % |
| Kombinasi 1:3 | 500,00 | 169,446 | 195,464 | 26,017 | 5,20 % |
| Kombinasi 3:1 | 500,00 | 144,531 | 173,018 | 28,487 | 5,70 % |

Perhitungan berat ekstrak

Berat ekstrak = berat wadah dengan ekstrak - berat wadah kosong

Berat ekstrak daun binahong = 166,955 gram - 141,186 gram = 25,769 gram

Berat ekstrak daun talas = 203,602 gram - 178,705 gram = 24,896 gram

Berat ekstrak kombinasi 1:1 = 193,326 gram - 167,108 gram = 26,218 gram

Berat ekstrak kombinasi 1:3 = 195,464 gram - 169,446 gram = 26,017 gram

Berat ekstrak kombinasi 3:1 = 173,018 gram - 144,531 gram = 28,487 gram

Perhitungan % Rendemen ekstrak terhadap serbuk

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (gram)}}{\text{bobot serbuk (gram)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen ekstrak daun binahong} = \frac{25,77 \text{ gram}}{500,00 \text{ gram}} \times 100\% = 5,15\%$$

$$\% \text{ Rendemen ekstrak daun talas} = \frac{24,89 \text{ gram}}{500,00 \text{ gram}} \times 100\% = 4,98\%$$

$$\% \text{ Rendemen kombinasi 1:1} = \frac{26,21 \text{ gram}}{500,00 \text{ gram}} \times 100\% = 5,24\%$$

$$\% \text{ Rendemen kombinasi 1:3} = \frac{26,02 \text{ gram}}{500,00 \text{ gram}} \times 100\% = 5,20\%$$

$$\% \text{ Rendemen kombinasi 3:1} = \frac{28,49 \text{ gram}}{500,00 \text{ gram}} \times 100\% = 5,70\%$$

Lampiran 13. Komposisi dan pembuatan media

1. *Brain Heart Infusion* (BHI)

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| Komposisi : Sari otak anak sapi | 12 gram |
| Sari jantung sapi | 5 gram |
| Proteose pepton | 10 gram |
| Bacto dextrose | 2 gram |
| NaCl | 5 gram |
| Dinatrium fosfor | 2,5 gram |
| Bacto agar | 15 gram |
| Aquadest | ad 1 L pH = 7,4 |

Cara pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

2. *Endo Agar* (EA)

| | |
|------------------------------|------------|
| Komposisi : Pepton from meat | 10 gram |
| Laktosa | 10 gram |
| DI-Potassium hidrogen fosfat | 3,5 gram |
| Sodium sulfit | 2,5 gram |
| Fuchsin | 0,4 gram |
| Agar-agar | 2,5 gram |
| Air steril | ad 1000 ml |

Cara pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998)

3. *Klinger Iron Agar (KIA)*

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

Cara pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan tuangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

4. *Sulfide Indol Motility (SIM)*

| | | |
|--------------------------------|--------|--------|
| Komposisi : Pepton from casein | 20 | gram |
| Pepton from meat | 6 | gram |
| Ammonium Iron (II) citrate | 0,2 | gram |
| Sodium thiosulfate | 0,2 | gram |
| Agar-agar | 0,2 | gram |
| Aquadest | ad 1 L | pH=7,4 |

Cara pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998)

5. *Lysine Iron Agar (LIA)*

| | | |
|------------------------------|--------|--------|
| Komposisi : Pepton from meat | 5 | gram |
| Yeast extract | 3 | gram |
| Glukosa | 1 | gram |
| Lysine monohydrochloride | 10 | gram |
| Sodium thiosulfate | 0,04 | gram |
| Ammonium Iron (II) citrate | 0,5 | gram |
| Bromo cresol purple | 0,02 | gram |
| Agar-agar | 12,5 | gram |
| Aquadest | ad 1 L | pH=7,4 |

Cara pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998)

6. Citrate Agar

| | | |
|--------------------------------------|--------|--------|
| Komposisi : Ammonium hydrogen fosfat | 1 | gram |
| DI-Potassium hydrogen fosfat | 1 | gram |
| Sodium chloride | 5 | gram |
| Magnesium sulfate | 0,2 | gram |
| Bromo thymol blue | 0,08 | gram |
| Agar-agar | 12,5 | gram |
| Aquadest | ad 1 L | pH=7,4 |

Cara pembuatan

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998)

Lampiran 14. Standard kekeruhan *Mc.Farland*

| Standard | Volume dalam mL | | Number of Bacterial/mL/(10 ⁸) Represented |
|----------|----------------------|-----------------------------------|---|
| | 1% BaCl ₂ | 1% H ₂ SO ₄ | |
| 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 15. Perhitungan konsentrasi uji dilusi

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

- a. Konsentrasi 33,33% = 0,33 gram/ ml
- b. Konsentrasi 16,66% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$
 $0,5 \cdot 33,33\% = 1 \cdot C2$
 $C2 = 16,66\%$
- c. Konsentrasi 8,33% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$
 $0,5 \cdot 16,66\% = 1 \cdot C2$
 $C2 = 8,33\%$
- d. Konsentrasi 4,16% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$
 $0,5 \cdot 8,33 = 1 \cdot C2$
 $C2 = 4,16\%$
- e. Konsentrasi 2,08% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$
 $0,5 \cdot 4,16\% = 1 \cdot C2$
 $C2 = 2,08\%$
- f. Konsentrasi 1,04% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$
 $0,5 \cdot 2,08\% = 1 \cdot C2$
 $C2 = 1,04\%$
- g. Konsentrasi 0,52% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$
 $0,5 \cdot 1,04\% = 1 \cdot C2$
 $C2 = 0,52\%$
- h. Konsentrasi 0,26% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$
 $0,5 \cdot 0,52\% = 1 \cdot C2$
 $C2 = 0,26\%$
- i. Konsentrasi 0,13% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$
 $0,5 \cdot 0,26\% = 1 \cdot C2$
 $C2 = 0,13\%$
- j. Konsentrasi 0,06% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$
 $0,5 \cdot 0,13\% = 1 \cdot C2$
 $C2 = 0,06\%$

Lampiran 16. Hasil analisis statistik diameter daerah hambat dari ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi 1:1, 1:3: dan 3:1 terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Uji kolmogorov Smirnov

Tujuan : mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANOVA

Kriteria uji : Sig. < 0,05 berarti H0 ditolak

Sig. > 0,05 H0 diterima

Hasil :

NPar Tests

Descriptive Statistics

| | N | Mean | Std. Deviation | Minimum | Maximum |
|------|----|---------|----------------|---------|---------|
| luas | 15 | 17,2833 | 6,01922 | 10,50 | 26,00 |

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | luas |
|----------------------------------|----------------|---------|
| N | | 15 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | 17,2833 |
| | Std. Deviation | 6,01922 |
| Most Extreme Differences | Absolute | ,221 |
| | Positive | ,221 |
| | Negative | -,145 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | ,856 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | ,456 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Kasimpulan : sig. > 0,05 (H0 diterima) maka data diameter daerah hambat (luas) terdistribusi normal

Uji Levene

Tujuan : untuk mengetahui homogenitas

Kriteria uji : Sig. <0,05 berarti H0 ditolak

Sig. >0,05 H0 diterima

Hasil :

Test of Homogeneity of Variances

Luas

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 2,000 | 4 | 10 | ,171 |

Kesimpulan : Sig. > 0,05 (H0 diterima) maka data diameter daerah hambat (luas) homogen

Uji One Way ANOVA

Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari diameter daerah hambat (luas) dari setiap ekstrak.

Kriteria uji : Sig. <0,05 (H0 ditolak)

Sig. >0,05 (H0 diterima)

Hasil :

ANOVA

Luas

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|------|
| Between Groups | 506,358 | 4 | 126,590 | 1446,738 | ,000 |
| Within Groups | ,875 | 10 | ,088 | | |
| Total | 507,233 | 14 | | | |

Kesimpulan : sig <0,05 (H0 ditolak) maka terdapat perbedaan diameter daerah hambat (luas) antar ekstrak.

Uji Post Hoc (LSD)

Tujuan : untuk mengetahui pada ekstrak mana terdapat perbedaan diameter daerah hambat (luas) yang bermakna

Hasil :

Multiple Comparisons

Luas

LSD

| (I) ekstrak | (J) ekstrak | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-------------|-------------|--------------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| B | T | 10,91667 [*] | ,24152 | ,000 | 10,3785 | 11,4548 |
| | 1;1 | 4,33333 [*] | ,24152 | ,000 | 3,7952 | 4,8715 |
| | 1:3 | 10,08333 [*] | ,24152 | ,000 | 9,5452 | 10,6215 |
| | 3:1 | -4,25000 [*] | ,24152 | ,000 | -4,7881 | -3,7119 |
| T | B | -10,91667 [*] | ,24152 | ,000 | -11,4548 | -10,3785 |
| | 1;1 | -6,58333 [*] | ,24152 | ,000 | -7,1215 | -6,0452 |
| | 1:3 | -,83333 [*] | ,24152 | ,006 | -1,3715 | -,2952 |
| | 3:1 | -15,16667 [*] | ,24152 | ,000 | -15,7048 | -14,6285 |
| 1;1 | B | -4,33333 [*] | ,24152 | ,000 | -4,8715 | -3,7952 |
| | T | 6,58333 [*] | ,24152 | ,000 | 6,0452 | 7,1215 |
| | 1:3 | 5,75000 [*] | ,24152 | ,000 | 5,2119 | 6,2881 |
| | 3:1 | -8,58333 [*] | ,24152 | ,000 | -9,1215 | -8,0452 |
| 1:3 | B | -10,08333 [*] | ,24152 | ,000 | -10,6215 | -9,5452 |
| | T | ,83333 [*] | ,24152 | ,006 | ,2952 | 1,3715 |
| | 1;1 | -5,75000 [*] | ,24152 | ,000 | -6,2881 | -5,2119 |
| | 3:1 | -14,33333 [*] | ,24152 | ,000 | -14,8715 | -13,7952 |
| 3:1 | B | 4,25000 [*] | ,24152 | ,000 | 3,7119 | 4,7881 |
| | T | 15,16667 [*] | ,24152 | ,000 | 14,6285 | 15,7048 |
| | 1;1 | 8,58333 [*] | ,24152 | ,000 | 8,0452 | 9,1215 |
| | 1:3 | 14,33333 [*] | ,24152 | ,000 | 13,7952 | 14,8715 |

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

Kesimpulan : dari hasil di atas tanda* pada *Mean Difference* menunjukkan bahwa semua ekstrak berbeda bermakna dengan ekstrak lainnya

Descriptives

Luas

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimu m | Maximu m |
|-------|----|---------|-------------------|---------------|-------------------------------------|----------------|-------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| B | 3 | 21,5000 | ,43301 | ,25000 | 20,4243 | 22,5757 | 21,25 | 22,00 |
| T | 3 | 10,5833 | ,14434 | ,08333 | 10,2248 | 10,9419 | 10,50 | 10,75 |
| 1:1 | 3 | 17,1667 | ,14434 | ,08333 | 16,8081 | 17,5252 | 17,00 | 17,25 |
| 1:3 | 3 | 11,4167 | ,38188 | ,22048 | 10,4680 | 12,3653 | 11,00 | 11,75 |
| 3:1 | 3 | 25,7500 | ,25000 | ,14434 | 25,1290 | 26,3710 | 25,50 | 26,00 |
| Total | 15 | 17,2833 | 6,01922 | 1,55415 | 13,9500 | 20,6167 | 10,50 | 26,00 |

Lampiran 17. Hasil analisis statistik konsentrasi dari ekstrak daun binahong dan daun talas serta kombinasi keduanya dengan variasi 3:1 terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Uji kolmogorov Smirnov

Tujuan : mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANOVA

Kriteria uji : Sig. < 0,05 berarti H0 ditolak

Sig. > 0,05 H0 diterima

Hasil :

NPar Tests

Descriptive Statistics

| | N | Mean | Std. Deviation | Minimum | Maximum |
|-------------|---|--------|----------------|---------|---------|
| konsentrasi | 9 | 9,8333 | 10,66234 | 1,04 | 33,33 |

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | konsentrasi |
|----------------------------------|----------------|-------------|
| N | | 9 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | 9,8333 |
| | Std. Deviation | 10,66234 |
| Most Extreme Differences | Absolute | ,258 |
| | Positive | ,258 |
| | Negative | -,205 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | ,775 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | ,586 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Kasimpulan : sig. > 0,05 (H0 diterima) maka data konsentrasi ekstrak terdistribusi normal

Uji Levene

Tujuan : untuk mengetahui homogenitas

Kriteria uji : Sig. < 0,05 berarti H0 ditolak

Sig. > 0,05 H0 diterima

Hasil :

Test of Homogeneity of Variances

Konsentrasi

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 11,077 | 2 | 6 | ,010 |

Kesimpulan : Sig. < 0,05 (H0 ditolak) maka data konsentrasi ekstrak homogen

Uji Kruskal-Wallis

Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari diameter daerah hambat (luas) dari setiap ekstrak.

Kriteria uji : Sig. <0,05 berarti H0 ditolak

Sig. >0,05 H0 diterima

Hasil :

NPar Tests

Descriptive Statistics

| | N | Mean | Std. Deviation | Minimum | Maximum |
|-------------|---|--------|----------------|---------|---------|
| konsentrasi | 9 | 9,8333 | 10,66234 | 1,04 | 33,33 |
| Ekstrak | 9 | 2,00 | ,866 | 1 | 3 |

Kruskal-Wallis Test

Ranks

| ekstrak | | N | Mean Rank |
|-------------|-------|---|-----------|
| Konsentrasi | B | 3 | 5,00 |
| | T | 3 | 8,00 |
| | 3:1 | 3 | 2,00 |
| | Total | 9 | |

Test Statistics^{a,b}

| | konsentrasi |
|-------------|-------------|
| Chi-square | 7,385 |
| Df | 2 |
| Asymp. Sig. | ,025 |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

ekstrak

Kesimpulan : sig <0,05 (H0 ditolak) maka terdapat perbedaan bermakna dari konsentrasi antar ekstrak.

Lampiran 18. Penjelasan hasil identifikasi senyawa flavonoid, saponin, tanin, alkaloid, dan terpenoid

a. Identifikasi flavonoid

Hasil positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah *et al.* 2014). Logam Mg dan HCl pekat pada uji ini berfungsi untuk mereduksi cincin benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium yang berwarna merah atau jingga (Tiwari *et al.* 2011).

b. Identifikasi saponin

Hasil positif saponin ditandai dengan terbentuknya busa dan tidak kurang dari 10 menit serta tidak hilang setelah penambahan HCl 2N. Timbulnya busa menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Marliana *et al.* 2005). Menurut Zahro dan Agustini (2013) busa yang ditimbulkan saponin karena adanya kombinasi struktur senyawa penyusunnya yaitu rantai sapogenin nonpolar dan rantai samping polar yang larut dalam air.

c. Identifikasi Alkaloid

Hasil positif alkaloid pada uji *Mayer* ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam. Pada uji alkaloid dengan pereaksi *Mayer* diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomercurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marliana *et al.* 2005).

Hasil positif alkaloid pada uji *Dragendorff* ditandai dengan terbentuknya endapan coklat sampai kuning. Endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada uji alkaloid dengan reagen *Dragendorff*, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam (Svehla 1990).

d. Identifikasi tanin

Hasil positif tanin ditandai dengan terbentuknya warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Alamsyah *et al.* 2014). Terbentuknya warna setelah penambahan FeCl_3 1% dalam air karena tanin akan bereaksi dengan ion Fe^{3+} membentuk senyawa kompleks (Herbone 1987).

e. Identifikasi terpenoid

Hasil positif terpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin coklat pada batas larutan saat ditambah dengan H_2SO_4 serta terlihat warna hijau. Prinsip reaksi dalam mekanisme uji terpenoid adalah kondensasi atau pelepasan H_2O dan penggabungan karbokation. Reaksi dimulai dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asam asetat anhidrida. Gugus asetil yang akan lepas sehingga terbentuk ikatan rangkap, selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya, mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik, diikuti dengan pelepasan hidrogen, akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan warna coklat (Siadi 2012).