

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA,  
ETIL ASETAT, DAN AIR DARI BUAH BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)  
TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



**Oleh:**

**Rossy Kurniawati**

**20144301A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA,  
ETIL ASETAT, DAN AIR DARI BUAH BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)  
TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

*SKRIPSI*

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



**Rossy kurniawati  
20144301A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**PENGESAHAN SKRIPSI**  
berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA,  
ETIL ASETAT, DAN AIR DARI BUAH BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)  
TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Oleh :  
**Rossy Kurniawati**  
**20144301A**

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada Tanggal : 1 Agustus 2018

Mengetahui ,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi



Dekan,

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

Pembimbing,

Dr. Drs. Supriyadi, M.Si

Pembimbing Pemdamping,

Dra. Kartinah Wiryosoendjoyo., SU

Penguji :

1. D. Andang Arif Wibawa, SP., MSi
2. Ismi Rahmawati, M.Si., Apt
3. Drs. Mardiyono, M.Si
4. Dr. Drs. Supriyadi, M.Si

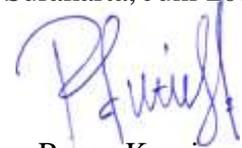
1.....  
2.....  
3.....  
4.....

## **PERNYATAAN**

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

Saya siap menerima sanksi secara akademis maupun hukum, apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian atau karya ilmiah atau skripsi orang lain.

Surakarta, Juni 2018



Rossy Kurniawati

## HALAMAN PERSEMBAHAN

*"Learn from yesterday,*

*live for today,*

*and hope for tomorrow."*

*(Albert Einstein)*

*"Some beautiful paths can't be discovered without getting lost."*

*(Erol Ozan)*

*"Keberhasilan adalah kemampuan untuk melewati dan mengatasi dari satu kegagalan ke kegagalan berikutnya tanpa kehilangan semangat."*

*(Winston Churchill)*

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

- ❖ Allah SWT terima kasih untuk semua nikmat dan rahmat serta  
kuasa-Mu
- ❖ Kedua orang tuaku, abah dan mama yang telah memberikan kasih  
sayang, selalu medoakan serta selalu mendukungu
  - ❖ Abang dan adikku tersayang
  - ❖ Teman-teman semua yang memotivasiku
  - ❖ Almamaterku

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpahan nikmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI BUAH BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923” ini tepat pada waktunya.

Skripsi ini disusun untuk memenuhi kewajiban penulis sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Penulis menyadari bahwa keberhasilan penelitian dan penulisan skripsi ini tidak luput dari bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Untuk itu penulis menyampaikan rasa terimakasih yang setulus-tulusnya kepada:

1. Dr. Djoni Taringan, MBA, selaku rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
3. Dwi Ningsih, S.Si., M.Farm., Apt, selaku pembimbing akademik senantiasa membimbing dan memberi nasihat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
4. Dr. Drs. Supriyadi, M.Si., selaku Pembimbing Utama dan Dra. Kartinah W.S., SU., selaku pembimbing pendamping yang telah berkenan meluangkan waktu guna memberikan arahan, bimbingan, dorongan, semangat, saran dan solusi selama penelitian dan penulisan Skripsi ini.
5. Tim penguji yang telah menyediakan waktu untuk menguji dan memberikan masukan demi kesempurnaan Skripsi ini.
6. Semua dosen dan asisten Laboratorium yang telah membantu dan mendampingi praktek Skripsi ini sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi ini.
7. Kedua orang tua, serta kakak, dan adikku dan keluarga besarku terima kasih telah memberikan motivasi, doa, kasih sayang, serta semangat dalam pembuatan skripsi ini.

8. Teman-teman yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu penyelesaian praktek Skripsi ini.

Dengan segala keterbatasan dan kekurangan yang ada, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih ada kekurangan, maka penulis menerima kritikan atau saran yang bersifat membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan khususnya di bidang kefarmasian.

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL.....	i
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Kegunaan Penelitian.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
A. Tanaman Bidara.....	5
1. Bidara ( <i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk.) .....	5
2. Klasifikasi <i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk.....	5
3. Morfologi <i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk. ....	5
4. Distribusi .....	6
5. Kandungan kimia.....	6
5.1 Alkaloid .....	6
5.2 Flavonoid .....	6
5.3 Saponin .....	6
5.4 Tanin.....	7
6. Khasiat .....	7
B. Simplisia .....	7
1. Pengertian simplisia.....	7
2. Pengumpulan simplisia.....	8
3. Pencucian dan pengeringan simplisia.....	8
4. Cara pembuatan .....	9
C. Penyarian .....	9
1. Pengertian penyarian .....	9
2. Metode maserasi.....	9
3. Fraksinasi.....	10
4. Pelarut.....	10
4.1 Etanol.....	11
4.2 <i>n</i> -heksana .....	11
4.3 Etil asetat .....	11

4.4 Air .....	11
D. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
1. Sistematika <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
2. Morfologi.....	12
3. Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
4. Metabolit <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
5. Toksin bakteri.....	14
6. Patogenesis .....	14
7. Pengobatan.....	15
E. Antibakteri .....	15
1. Definisi .....	15
2. Mekanisme kerja antibakteri .....	16
F. Uji Aktivitas Antibakteri .....	16
1. Metode difusi.....	16
2. Metode dilusi .....	17
G. Media .....	17
H. Sterilisasi .....	18
I. Gentamisin.....	19
J. Landaran Teori .....	19
K. Hipotesis .....	21
 BAB III METODE PENELITIAN .....	 23
A. Populasi dan sampel .....	23
1. Populasi .....	23
2. Sampel .....	23
B. Variabel penelitian.....	23
1. Identifikasi variabel utama .....	23
2. Klasifikasi variabel utama .....	23
2.1 Variabel bebas .....	24
2.2 Variabel terkendali .....	24
2.3 Variabel tergantung .....	24
3. Definisi operasional variabel utama .....	24
C. Alat dan Bahan .....	25
1. Alat .....	25
2. Bahan .....	25
D. Jalannya Penelitian .....	26
1. Determinasi tanaman .....	26
2. Pembuatan serbuk buah bidara .....	26
3. Penetapan susut pengeringan serbuk buah bidara .....	26
4. Pembuatan ekstrak buah bidara .....	26
5. Tes bebas etanol ekstrak buah bidara .....	27
6. Fraksinasi.....	27
7. Identifikasi kandungan kimia .....	27
7.1 Uji alkaloid .....	27
7.2 Uji flavonoid.....	28

7.3 Uji saponin.....	28
7.4 Uji tanin.....	28
8 Sterilisasi .....	28
9 Identifikasi bakteri uji <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	28
10 Pembuatan suspensi bakteri uji.....	29
11 Pengujian aktivitas antibakteri buah bidara secara difusi....	30
12 Pengujian aktivitas antibakteri buah bidara secara dilusi ....	30
13 Identifikasi kandungan kimia secara KLT.....	31
13.1. Uji alkaloid .....	31
13.2. Uji Flavonoid .....	32
13.3. Uji saponin.....	32
13.4. Uji tanin .....	32
E. Analisis data .....	32
F. Skema Penelitian .....	33
 BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....	 38
1. Determinasi tanaman .....	38
2. Pembuatan serbuk buah bidara .....	38
3. Penetapan susut pengeringan serbuk buah bidara .....	39
4. Pembuatan ekstrak buah bidara .....	39
5. Tes bebas etanol ekstrak buah bidara .....	40
6. Fraksinasi.....	40
6.1 Fraksinasi <i>n</i> -heksana .....	40
6.2 Fraksinasi etil asetat .....	41
6.3 Fraksinasi air .....	41
7. Identifikasi kandungan kimia .....	41
8. Identifikasi bakteri uji <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ..	43
9. Pembuatan suspensi bakteri uji .....	44
10. Pengujian aktivitas antibakteri buah bidara secara difusi.....	44
11. Pengujian aktivitas antibakteri buah bidara secara dilusi.....	47
12. Identifikasi kandungan kimia secara KLT .....	48
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	 50
A. Kesimpulan .....	50
B. Saran.....	50
 DAFTAR PUSTAKA .....	 51
 LAMPIRAN .....	 56

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 1. Tanaman <i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk. (a), buah <i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk. (b) .....	5
Gambar 2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi buah bidara <i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk. ....	33
Gambar 4. Skema uji aktivitas antibakteri .....	34
Gambar 5. Skema pembuatan suspensi bakteri .....	35
Gambar 6. Skema pengujian antibakteri dengan metode difusi terhadap bakteri .....	36
Gambar 7. Skema pengujian antibakteri dengan metode dilusi terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	37

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 1. Rendemen bobot kering terhadap bobot basah buah bidara.....	38
Tabel 2. Hasil penetapan kadar air serbuk bidara .....	39
Tabel 3. Pembuatan ekstrak etanol buah bidara.....	39
Tabel 4. Tes bebas etanol dari ekstrak buah bidara.....	40
Tabel 5. Rendemen fraksi <i>n</i> -heksana buah bidara.....	40
Tabel 6. Rendemen fraksi etil asetat .....	41
Tabel 7. Rendemen fraksi air .....	41
Tabel 8. Hasil Hasil uji kandungan kimia serbuk, ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan air buah bidara.....	42
Tabel 9. Diameter hambat pada uji antibakteri buah bidara terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara difusi .....	45
Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri secara dilusi.....	47

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman .....	57
Lampiran 2. Hasil pembuatan sebuk bidara .....	58
Lampiran 3. Gambar alat yang digunakan.....	59
Lampiran 4. Perhitungan rendemen bobot kering terhadap bobot basah buah bidara .....	60
Lampiran 5. Perhitungan rendemen ekstrak etanol buah bidara.....	61
Lampiran 6. Hasil tes bebas etanol .....	62
Lampiran 7. Hasil fraksinasi .....	63
Lampiran 8. Perhitungan rendemen fraksi <i>n</i> -heksana buah bidara.....	64
Lampiran 9. Perhitungan rendemen fraksi etil asetat .....	65
Lampiran 10. Perhitungan rendemen fraksi air .....	66
Lampiran 11. Hasil identifikasi golongan senyawa.....	67
Lampiran 12. Hasil identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	68
Lampiran 13. Hasil pembuatan suspensi bakteri uji .....	69
Lampiran 14. Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi.....	70
Lampiran 15. Perhitungan pembuatan seri konsentrasi ekstrak dan fraksi metode difusi.....	73
Lampiran 16. Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi .....	74
Lampiran 17. Perhitungan larutan stok fraksi etil asetat metode dilusi.....	75
Lampiran 18. Hasil indentifikasi kandungan kimia secara KLT .....	76
Lampiran 19. Hasil perhitungan Rf .....	78
Lampiran 20. Hasil analisis data metode difusi secara ANOVA .....	80
Lampiran 21. Formulasi dan pembuatan media .....	84

## INTISARI

**KURNIAWATI, R., 2018. UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI BUAH BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.**

Tumbuhan bidara dikenal dengan nama latin *Zizyphus mauritiana* Lamk. merupakan tanaman yang memiliki banyak khasiat dalam pengobatan tradisional. Bidara diketahui memiliki manfaat sebagai antioksidan, antimikroba, antidiare, antidiabetik, hepatoprotektif, dan antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari buah bidara terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Buah bidara diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan air. Hasil fraksinasi diuji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% dan metode dilusi untuk dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,57%, 0,79%, 0,40%, 0,20%, 0,10%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari buah bidara memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Konsentrasi 50% dari fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dengan diameter hambat sebesar 18,67 mm dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 3,13% terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

---

Kata kunci: bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, antibakteri, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air.

## ABSTRACT

**KURNIAWATI, R., 2018. ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF ETHANOL EXTRACT, FRACTION *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE AND WATER FROM FRUIT BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) AGAINST *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.**

The bidara plant known by the Latin name *Zizyphus mauritiana* Lamk. is a plant that has many benefits in traditional medicine. Bidara is known to have benefits as antioxidant, antimicrobial, antidiarrheal, antidiabetic, hepatoprotective, and anticancer. This study aims to determine the antibacterial activity of ethanol extract, fraction *n*-hexane, ethyl acetate, and water from the fruit bidara against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Fruit bidara was extracted by maceration method with ethanol 70% solvent. The extracts obtained were fractionated with solvents *n*-hexane, ethyl acetate, and water. Fractionation results were tested for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 using diffusion method with concentrations of 50%, 25%, 12.5% and dilution methods with concentrations of 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3, 13%, 1.57%, 0.79%, 0.40%, 0.20%, 0.10%.

The results showed that ethanol extract, fractions *n*-hexane, ethyl acetate, and water of bidara had antibacterial activity against bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Concentration of 50% of ethyl acetate fraction had the most effective antibacterial activity with inhibitory diameter of 18.67 mm and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of 3,13% against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

---

Keywords: bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, antibacterial, fraction *n*-hexane, ethyl acetate, and water.

# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Penyakit infeksi masih merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk dinegara berkembang, termasuk Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri (Radji 2010). Faktor penyebab infeksi, banyak disebabkan oleh beberapa bakteri Gram positif dan Gram negatif. Salah satu penyebab infeksi terbesar dari bakteri Gram positif, diantaranya dari Genus *Staphylococcus* (Guntur 2007).

Genus *Staphylococcus* mempunyai paling sedikit 40 spesies. Tiga spesies yang paling sering dijumpai yang mempunyai kepentingan klinis adalah *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus saprophyticus*. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen utama untuk manusia. Hampir setiap orang akan mengalami beberapa jenis infeksi *Staphylococcus aureus* sepanjang hidup, dengan kisaran keparahan dari keracunan makanan atau infeksi kulit minor hingga infeksi berat yang mengancam jiwa (Jawetz *et al.* 2012).

Beberapa genus *Staphylococcus* adalah flora normal kulit dan membran mukosa manusia lainnya menyebabkan supurasi, pembentukan abses, berbagai infeksi piogenik, dan bahkan septikemia yang fatal. *Staphylococcus* patogen sering kali menghemolisis darah, menyebabkan koagulasi plasma, dan menghasilkan berbagai toksin serta enzim ekstraseluler. Keracunan makanan yang paling umum disebabkan oleh enterotoksin *Staphylococcus* yang stabil panas (Jawetz *et al.* 2012).

Pemberian terapi antimikroba merupakan salah satu tata laksana penyakit infeksi yang bertujuan untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme di dalam tubuh. Mikroba penyebab infeksi yang telah resisten terhadap antimikroba yang digunakan, maka mikroba tersebut terus bertahan hidup dan berkembang biak sehingga proses infeksi terus berlanjut. Permasalahan

resistensi terus meningkat di berbagai negara termasuk Indonesia (Permenkes 2017).

Kasus resistensi bakteri terhadap antibiotik menjadi suatu masalah serius dalam dunia kesehatan. Peningkatan kasus resistensi bakteri tidak diimbangi dengan penemuan antibiotik baru. Peningkatan kasus infeksi salah satunya disebabkan oleh bakteri patogen oportunistik *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* dapat menimbulkan penyakit infeksi serius antara lain sepsis, pneumonia, endokarditis, osteomielitis, gastroenteritis, dan abses. Tingkat infeksi *Staphylococcus aureus* terus meningkat dekade terakhir dan berkembang permasalahan resistensi antibiotik dalam pengobatan infeksi *Staphylococcus aureus* (Agustina 2015). Penelitian perlu dilakukan untuk memperoleh alternatif pengobatan menggunakan bahan atau senyawa yang lebih aman dan tidak menimbulkan resistensi.

Tumbuhan bidara dikenal dengan nama latin *Zizyphus mauritiana* Lamk. merupakan tanaman yang memiliki banyak khasiat dalam pengobatan tradisional. Bidara dapat digunakan untuk pengobatan alergi, bronkitis kronis, insomnia, depresi dan penyakit hati (Das 2012). Semua bagian dari tanaman ini sangat efektif terhadap berbagai jenis penyakit. Daunnya bermanfaat dalam pengobatan diare, luka, abses, pembengkakan, dan gonore (Rathore 2012). Buah dari *Zizyphus mauritiana* Lamk. sangat berguna bagi kesehatan manusia (Parmar *et al.* 2012). Buah digunakan sebagai pencahar, luka, bisul serta penyakit paru dan demam. Daunnya membantu mengatasi masalah gangguan hati, asma dan demam (Dahiru *et al.* 2006). Bidara memiliki manfaat dalam pengobatan sebagai antioksidan, antimikroba, antidiare, antidiabetik, hepatoprotektif, dan antikanker yang telah dilaporkan dalam studi dan literatur (Lim 2013).

Penelitian terdahulu menyatakan bahwa buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) memiliki potensi yang baik sebagai antibakteri dan sebagai antioksidan (Das 2012). Berdasarkan latar belakang, peneliti tertarik melakukan penelitian untuk menguji potensi fraksi-fraksi ekstrak etanol buah bidara terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini perlu dilakukan untuk menguji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak buah

bidara terhadap *Staphylococcus aureus*. Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan golongan senyawa. Fraksinasi dapat menarik senyawa kimia yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri sesuai sifat kepolaran pelarut yang digunakan.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi berguna untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen mikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan agar. Metode dilusi dapat digunakan untuk mengukur Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) (Pratiwi 2008).

## **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang diatas dapat dirumuskan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut:

Pertama, apakah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

Kedua, manakah diantara ketiga fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) dari ekstrak etanol buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang paling efektif sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

Ketiga, berapakah Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

### **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah:

Pertama, untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Kedua, untuk mengetahui fraksi dari ekstrak etanol buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang memiliki aktivitas paling efektif sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Ketiga, untuk mengetahui Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### **D. Kegunaan Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai pengetahuan dan informasi tambahan bagi masyarakat luas bahwa buah bidara memiliki khasiat antibakteri dan juga sebagai tambahan referensi untuk penelitian lebih lanjut mengenai buah bidara sebagai antibakteri.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### A. Tanaman Bidara

#### 1. Bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)

Bidara yang memiliki nama latin *Zizyphus mauritiana* Lamk. di kenal dengan beberapa nama daerah yaitu Widara (Jawa, Sunda) Rangga (Bima), Kalangga (Sumba) dan Bekul (Bali) (Heyne 1987).

#### 2. Klasifikasi *Zizyphus mauritiana* Lamk.

Klasifikasi menurut Upadhyay *et al* 2012:

Kingdom	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Order	: Rosales
Family	: Rhamnaceae
Genus	: <i>Zizyphus</i>
Species	: <i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk.

#### 3. Morfologi *Zizyphus mauritiana* Lamk.

*Zizyphus mauritiana* Lamk. merupakan pohon berduri dengan tinggi hingga 15 m, dengan diameter batang 40 cm atau lebih. Kulit batang abu-abu gelap atau hitam, pecah-pecah tidak teratur. Daun tunggal dengan ujung membulat atau sedikit berlekuk, dan bergelombang dibagian tepi. Buah berbiji satu, bulat sampai bulat telur dengan ukuran kira-kira 4-6 cm, kulit buah halus atau kasar, mengkilap, warna kekuningan sampai kemerahan, daging buah putih, renyah agak asam hingga manis (Goyal *et al.* 2012).



Gambar 1. Tanaman *Zizyphus mauritiana* Lamk. (a), buah *Zizyphus mauritiana* Lamk. (b).

#### 4. Distribusi

Khusus di Indonesia, *Zizyphus mauritiana* Lamk. tumbuh liar di seluruh Jawa dan Bali pada ketinggian di bawah 400 meter dari permukaan laut. Tanaman ini tumbuh pada daerah dengan suhu ekstrim dan tumbuh subur pada daerah dengan kondisi kering (Heyne 1987; Steenis *et al.* 2005).

#### 5. Kandungan kimia

Tumbuhan *Zizyphus mauritiana* Lamk. secara keseluruhan mengandung beberapa golongan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, glikosida, saponin, resin, polifenol, dan vitamin. Bagian buah tumbuhan ini merupakan salah satu sumber yang baik untuk vitamin C, gula, dan beberapa mineral. Sari buah (*plup*) *Zizyphus mauritiana* Lamk. diketahui mengandung protein, lemak, karbohidrat, kalsium, fosfor, zat besi, pigmen karoten, vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>. Buahnya juga mengandung tanin, flavonoid, saponin, dan, asam organik (askorbat, asam tartat dan asam sitrat) (Gaur & Sharma 2013).

**5.1 Alkaloid.** Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang banyak terdapat di alam. Hampir seluruh alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Ciri khas alkaloid adalah bahwa semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom N yang bersifat basa. Pada umumnya, alkaloid basa larut dalam pelarut organik relatif nonpolar dan susah larut dalam air (Endarini 2016).

**5.2 Flavonoid.** Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar ditemukan di alam. Flavonoid juga disebut senyawa polar karena memiliki sejumlah gugus yang hidroksil yang tidak tersubstitusi. Pelarut polar seperti etanol, methanol, etil asetat, atau campuran dari pelarut tersebut dapat digunakan untuk ekstraksi flavonoid dari jaringan tumbuhan (Rijke 2005). Flavonoid adalah senyawa yang bersifat polar. Senyawa ini dapat bekerja sebagai antibakteri karena dapat mendenaturasi dan mengkoagulasi protein sel bakteri sehingga bakteri mati (Wiryowidagdo & Silanggang 2008).

**5.3 Saponin.** Saponin adalah senyawa aktif dengan permukaan yang kuat dan menimbulkan busa jika dikocok dalam air. Saponin merupakan senyawa antibakteri karena memiliki kemampuan dalam menghambat fungsi membran sel

sehingga merusak permeabilitas membran yang mengakibatkan dinding sel rusak atau hancur (Ayuningtyas 2008).

**5.4 Tanin.** Tanin adalah salah satu metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dan disintesis oleh tanaman. Tanin tergolong senyawa polifenol yang karakteristiknya dapat membentuk senyawa kompleks. Tanin larut dalam pelarut organik polar namun tidak larut dalam pelarut organik nonpolar (Jayanegara *et al.* 2008). Tanin memiliki mekanisme penghambatan bakteri dengan membentuk kompleks polisakarida yang dapat merusak dinding sel bakteri (Nurhalimah *et al.* 2014).

## **6. Khasiat**

Tanaman *Zizyphus mauritiana* Lamk. banyak memiliki kegunaan. Secara tradisional, tumbuhan ini digunakan sebagai tonik. Biji dari tanaman ini *Zizyphus mauritiana* Lamk. dilaporkan memiliki efek sedatif dan direkomendasikan sebagai obat tidur. Selain itu, berkhasiat untuk menghentikan mual, muntah, dan untuk meredakan nyeri saat kehamilan dan untuk penyembuhan luka. Daun *Zizyphus mauritiana* Lamk. untuk mengobati diare, penurun panas dan sebagai obat antiobesitas. Akar *Zizyphus mauritiana* Lamk. berkhasiat untuk mengobati demam, dan serbuknya untuk mengobati luka. Kulit batang digunakan untuk pengobatan diare dan bisul. Buah *Zizyphus mauritiana* Lamk. memiliki efek laksatif ringan (Goyal *et al.* 2012; Gaur & Sharma 2013).

## **B. Simplisia**

### **1. Pengertian simplisia**

Simplisia adalah bahan alamiah berupa tanaman utuh, bagian tanaman, atau eksudat yang digunakan sebagai obat dan belum mengalami pengolahan atau mengalami pengolahan secara sederhana serta belum merupakan zat murni kecuali dinyatakan lain berupa bahan yang telah dikeringkan (BPOM RI 2007). Simplisia harus memenuhi persyaratan minimal untuk menjamin keseragaman senyawa aktif, kemampuan maupun kegunaannya. Faktor yang mempengaruhi yaitu bahan baku simplisia, proses pembuatan simplisia termasuk cara penyimpanan bahan baku simplisia dan cara pengepakan (Depkes RI 2000).

## **2. Pengumpulan simplisia**

Simplisia berdasarkan bahan bakunya dapat diperoleh dari tanaman liar atau tanaman obat hasil budidaya. Jika simplisia diambil dari tanaman budidaya maka keseragaman umur, masa panen, dan galur (asal-usul, garis keturunan) tanaman dapat dipantau. Pengambilan simplisia dari tanaman liar akan didapat banyak kendala variabilitas yang tidak bisa dikendalikan seperti asal tanaman, umur, dan tempat tumbuh (Depkes RI 2000).

Waktu panen sangat erat hubungannya dengan pembentukan senyawa aktif di dalam bagian tanaman yang akan dipanen. Waktu panen yang tepat adalah pada saat bagian tanaman tersebut mengandung senyawa aktif dalam jumlah besar. Senyawa aktif dalam jumlah besar terbentuk secara maksimal di dalam bagian tanaman pada umur tertentu (Depkes RI 1985).

## **3. Pencucian dan pengeringan simplisia**

Pencucian dilakukan untuk membersihkan tanaman/simplisia dari benda-benda asing (tanah, batu dsb) serta memisahkan bagian tanaman yang tidak diinginkan. Proses pengeringan bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang awet, tidak rusak, dapat bertahan dalam waktu yang lama. Kekeringan simplisia yaitu dengan menghitung kadar air yang dikandungnya kira-kira 10%, dengan kadar air yang demikian diharapkan dapat menghentikan proses enzimatik yang memungkinkan dapat merusak zat aktif simplisia, selain itu juga dimaksudkan untuk mendapatkan hasil pemisahan yang sempurna pada proses ekstraksi (Depkes RI 1985).

Cara pengeringan dibedakan menjadi dua, yaitu pengeringan secara alamiah dan pengeringan buatan. Pengeringan secara alamiah dapat dilakukan dengan sinar matahari langsung, untuk bagian-bagian tanaman yang keras (kayu, kulit biji, biji) dan mengandung zat aktif yang relatif stabil atau dengan diangin-anginkan pada tempat yang tidak terkena sinar matahari langsung, terutama untuk simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah rusak oleh sinar ultraviolet dan matahari. Pengeringan buatan dilakukan dengan menggunakan alat yang dapat diatur suhu, kelembaban, tekanan, atau sirkulasi udara (Depkes RI 1985).

#### **4. Cara pembuatan**

Ada beberapa tahapan yang harus ditempuh untuk pembuatan simplisia. Tahap pertama dimulai pengumpulan bahan baku yang sangat berhubungan dengan pembentukan senyawa aktif suatu tanaman. Bahan yang telah dikumpulkan kemudian dilakukan sortasi basah dan pencucian selanjutnya dilakukan pengeringan (Depkes RI 1985).

### **C. Penyarian**

#### **1. Pengertian penyarian**

Ekstraksi adalah cara untuk mendapatkan senyawa atau bahan aktif yang berada di dalam jaringan dan sel tanaman. Pemilihan metode ekstraksi bergantung pada bagian tanaman yang akan diekstraksi dan bahan aktif yang diinginkan (Endarini 2016). Cairan pelarut dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung (Depkes RI 2000).

Metode ekstraksi yang ideal adalah metode ekstraksi yang mampu mengekstraksi bahan aktif yang diinginkan sebanyak mungkin, cepat, mudah dilakukan, murah, ramah lingkungan, dan hasil yang diperoleh konsisten jika dilakukan berulang-ulang (Endarini 2016).

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Pelarut yang diperbolehkan adalah air dan alkohol (etanol) serta campurannya. Pelarut lain seperti metanol, heksana, toluen, kloroform, aseton, umumnya digunakan sebagai pelarut untuk tahap separasi dan tahap pemurnian (fraksinasi) (Depkes RI 2000).

#### **2. Metode maserasi**

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

pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Prinsip maserasi adalah pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Depkes RI 2000).

Maserasi kecuali dinyatakan lain dilakukan dengan cara, dimasukkan 10 bagian simplisia atau simplisia dengan derajat halus yang cocok kedalam sebuah bejana, dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya matahari sambil sering diaduk, dikerai, diperas, dicuci ampas dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian (BPOM RI 2007). Keuntungan metode maserasi adalah bagian tanaman yang akan diekstraksi tidak harus dalam bentuk serbuk, tidak diperlukan keahlian khusus, dan lebih sedikit kehilangan pelarut. Kerugiannya adalah perlunya dilakukan pengojokan/ pengadukan, pengepresan dan penyaringan, terjadinya residu pelarut diampas, serta mutu produk akhir yang tidak konsisten (Endarini 2016).

### **3. Fraksinasi**

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dengan golongan utama yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Pemisahan jumlah dan jenis fraksi yang berbeda, mula-mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Pelarut secara efektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula akan disari dengan pelarut nonpolar, kemudian disari dengan pelarut yang kurang polar, dan yang terakhir disari dengan pelarut polar (Harborne 1987).

### **4. Pelarut**

Pemilihan pelarut sangat penting dalam melakukan penyarian. Faktor utama untuk mempertimbangkan dalam pemilihan pelarut adalah selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan, dan aman (Depkes RI 2000).

**4.1 Etanol.** Etanol merupakan senyawa organik dengan rumus kimia  $C_2H_5OH$  atau disebut juga etil alkohol yang dipasaran lebih dikenal dengan etanol. Etanol 70% merupakan larutan serba guna yang baik untuk ekstraksi

pendahuluan agar diperoleh hasil yang baik, penyarian biasanya digunakan campuran antara etanol dan air. Etanol 70% dipertimbangkan sebagai penyari karena lebih efektif dalam menghasilkan jumlah bahan yang optimal dan bahan yang perlukan hanya sedikit yang turut ke dalam pengestraksi. Keuntungan etanol 70% antara lain tidak beracun, absorpsinya baik, sulit ditumbuhi mikroorganisme, efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal dimana bahan pengotor hanya dalam skala kecil ikut dalam cairan pengestraksi, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan dan dapat melarutkan alkaloid, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakinnon, flavonoid, steroid, tanin, dan saponin (List 2000).

**4.2 *n*-Heksana.** *n*-heksana merupakan pelarut senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia  $C_6H_{14}$ . Senyawa ini merupakan pelarut nonpolar berupa cairan yang jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar dan mempunyai bau seperti eter lemah atau bau seperti petroleum, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. *n*-heksana (pelarut nonpolar) dapat melarutkan (Harborne 1987). Pelarut *n*-heksana dipilih dalam penelitian ini karena memiliki nilai tetapan dielektrik yang lebih kecil dibandingkan dengan pelarut nonpolar lainnya seperti toluene, benzene, dan sikloheksana yaitu sebesar 2,0. Semakin kecil nilai tetapan dielektrik dari pelarut maka pelarut tersebut semakin bersifat nonpolar (Khopkar 2003).

**4.3 Etil asetat.** Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus  $CH_3CH_2OC(O)CH_3$  yang sering disingkat EtOAc, dengan Et mewakili gugus etil dan OAc mewakili asetat. Etil asetat merupakan pelarut yang semipolar, mudah terbakar dan mudah menguap sehingga penyimpanannya didalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas, cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah, larut dalam 15 bagian air, dapat bercampur dalam eter, etanol dan kloroform. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut etil asetat yaitu flavonoid, alkaloid, saponin dan polifenol (Harborne 1987).

**4.4 Air.** Air adalah pelarut yang sangat polar dengan rumus kimia  $H_2O$ . Air cocok digunakan untuk menyari senyawa-senyawa organik polar dalam proses fraksinasi. Pelarut air dapat melarutkan garam alkaloid, glikosida, tanin, saponin,

gom, protein, enzim, lilin, pektin dan zat warna asam organik (Depkes RI 1986). Pemilihan pelarut air pada penelitian ini karena pelarut air memiliki nilai tetapan dielektrik yang lebih besar dibandingkan dengan pelarut polar yang lainnya seperti metanol dan etanol yaitu sebesar 78,5. Semakin besar nilai tetapan dielektrik dari pelarut maka pelarut tersebut semakin bersifat polar (Khopkar 2003).

#### **D. *Staphylococcus aureus***

##### **1. Sistematika *Staphylococcus aureus***

Menurut Jawetz *et al.* (2005) sistematika ilmiah dari *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Protophyta
Classis	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Micrococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>



**Gambar 2. *Staphylococcus aureus*.**

##### **2. Morfologi**

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif, berbentuk bulat. Staphylococcus berdiameter 0,8-1,0  $\mu\text{m}$  tidak bergerak dan tidak berspora (Radji 2010). Tumbuh paling cepat pada suhu 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu ruang (20-25°C). Koloni pada media solid membentuk warna abu-

abu hingga kuning emas pekat. Beberapa *Staphylococcus aureus* tergolong flora normal kulit dan selaput lendir manusia, lainnya menyebabkan supurasi, pembentukan abses, berbagai infeksi patogenik, dan bahan septikemia yang fatal (Jawetz *et al.* 2012).

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen yang bersifat invasif dapat menginvasi jaringan atau organ tubuh manusia sehingga menyebabkan infeksi jaringan yang terdeteksi dengan ciri-ciri khas yaitu supurasi fokal (abses) (Jawetz *et al.* 2012)

### **3. Identifikasi *Staphylococcus aureus***

Staphylococcus adalah bakteri Gram positif. *Staphylococcus aureus* bersifat koagulase positif, yang membedakannya dari spesies lainnya. Staphylococcus memfermentasikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat, tetapi tidak ada gas. *Staphylococcus aureus* biasanya membentuk koloni berwarna abu-abu hingga kuning emas pekat. *Staphylococcus aureus* tumbuh dengan mudah pada sebagian besar media bakteriologis dengan kondisi aerob atau mikroaerofilik, tumbuh cepat pada suhu 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu ruang (20-25°). Koloni pada media padat berbentuk bulat, halus, timbul, dan mengkilat (Jawetz *et al.* 2012).

Identifikasi *Staphylococcus aureus* adalah dengan mengisolasi sampel pada medium selektif yang sesuai. Koloni yang tumbuh pada medium diamati dan dilanjutkan dengan berbagai uji, yaitu perwarnaan Gram, uji katalase, dan uji koagulase. Uji tersebut untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan bakteri coccus lainnya (Iskamto 2009).

### **4. Metabolit *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* menghasilkan tiga macam metabolit, yaitu metabolit nontoksin, eksotoksin, dan enterotoksin. Metabolit yang termasuk nontoksik adalah antigen permukaan, koagulase, lipase, tributirinase, fosfatase, dan katalase. Metabolit yang termasuk eksotoksin terdiri dari  $\alpha$ -hemolisin,  $\beta$ -hemolisin, leukosidin, sitoksin, dan toksin eksfoliatin. Metabolit enterotoksin terbentuk jika *Staphylococcus aureus* ditanam dalam pembenihan semisolid yang mengandung CO<sub>2</sub> 30% (Radji 2010).

## 5. Toksin bakteri

*Staphylococcus* patogen sering kali megghemolisis darah, menyebabkan koagulasi plasma, dan menghasilkan berbagai toksin serta enzim ekstraselular (Jawetz *et al.* 2012). *Staphylococcus aureus* mengeluarkan toksin pada makanan berprotein tinggi (daging, telur, susu, ikan). *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu kuman yang cukup kebal di antara mikroorganisme lainnya, dan tahan pada pemanasan 60°C selama 30 menit. Bakteri ini memproduksi enterotoksin yang bersifat stabil terhadap pemanasan (termostabil), tahan terhadap aktivitas pemecahan oleh enzim-enzim pencernaan, dan relatif resisten terhadap pengeringan. Selain enterotoksin, bakteri ini juga memproduksi hemolisin, yaitu toksin yang dapat merusak dan memecah sel-sel darah merah (Radji 2010).

## 6. Patogenesis

*Staphylococcus aureus* ini dapat ditemukan di udara dan lingkungan sekitar kita. Patogenitas penyebab infeksi oleh *Staphylococcus aureus* ini dapat terjadi dengan mekanisme antara lain: pelekatan pada protein sel inang, invasi, perlawanan terhadap sistem pertahanan inang, dan pelepasan beberapa jenis toksin (Radji 2010).

Respon sel inang dimediasi oleh leukosit yang diperoleh dari ekspresi molekul adhesi pada sel endotel. Komponen dinding sel dari *Staphylococcus aureus* yaitu peptidoglikan dan asam teikoat, memacu pelepasan sitokin. Leukosit dan faktor sel inang lainnya dapat dirusak oleh toksin yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Adanya protein yang terdapat pada bakteri mengakibatkan respon antiinflamasi. Protein juga menghambat sekresi leukosit sel inang dengan cara berinteraksi langsung dengan protein sel inang dan fibrinogen. Apabila tubuh tidak cukup berhasil mengatasi infeksi tersebut maka akan terjadi inflamasi lokal (Todar 2005).

Kapasitas patogenik suatu galur *Staphylococcus aureus* adalah efek kombinasi faktor ekstraseluler dan toksin bersama dengan sifat invasif galur itu. *Staphylococcus aureus* yang invasif dan patogenik menghasilkan koagulasi dan cenderung menghasilkan pigmen kuning serta bersifat hemolitik (Jawetz *et al.* 2012).

## 7. Pengobatan

Pengobatan terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* biasanya menggunakan berbagai jenis antibiotik seperti tetrasiklin, vankomisin, atau penisilin resisten  $\beta$ -laktam. Perbedaan jenis obat yang diberikan dipertimbangkan dari angka resistensi bakteri terhadap suatu antibiotik. Antibiotik yang biasa digunakan dalam penelitian adalah tetrasiklin, oxacillin, gentamisin, eritromisin, kloramfenikol, dan trimetoprim-sulfametoksazol (Endang & Severin 2009).

### E. Antibakteri

#### 1. Definisi

Antibakteri adalah suatu senyawa yang dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan suatu mikroorganisme (Jawetz *et al.* 2007). Istilah yang digunakan untuk menjelaskan proses pembasmian bakteri diantaranya adalah germisid, bakterisida, bakteriostatika, antiseptik, desinfektan (Dianasari 2009).

Suatu zat aktif dikatakan memiliki potensi tinggi sebagai antibakteri jika pada konsentrasi yang rendah memiliki daya hambat yang besar. Zat bakteriostatik ialah zat yang menghambat pertumbuhan bakteri. Agensia mikrobiostatik ialah zat atau kondisi yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan mikroba. Zat antibakteri dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri), dan germisidal (menghambat germinasi spora bakteri). Kemampuan suatu zat antimikroba dalam menghambat pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya: 1) konsentrasi zat antimikroba, 2) jenis, jumlah, umur, dan keadaan mikroba, 3) suhu, 4) waktu, dan 5) sifat-sifat kimia dan fisik makanan termasuk kadar air, pH, jenis dan jumlah komponen didalamnya (Agustrina 2011).

Ruang lingkup yang dapat dipengaruhi oleh zat antibakteri disebut dengan spektrum antibakteri. Berdasarkan spektrum aksinya, zat antibakteri dibagi menjadi 3, yaitu: 1) Spektrum luas, zat antibakteri dikatakan berspektrum luas apabila zat tersebut efektif melawan prokariot, baik membunuh atau menghambat bakteri dengan Gram positif dan Gram negatif dalam lingkup yang luas. 2)

Spektrum sempit, zat antibakteri yang efektif melawan sebagian bakteri Gram positif atau Gram negatif. 3) Spektrum terbatas, zat antibakteri yang efektif melawan suatu spesies bakteri tertentu (Agustrina 2011).

## **2. Mekanisme kerja antibakteri**

Aktivitas antibakteri dibagi menjadi 2 macam yaitu, aktivitas bakteristatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen dalam kisaran luas) (Jawetz *et al.* 2005).

Mekanisme antibakteri dibagi dalam 5 kelompok, yaitu mengganggu metabolisme sel mikroba, menghambat sintesis dinding sel, mengganggu permeabilitas membran sel, menghambat sintesis protein sel, dan menghambat sintesis/merusak asam nukleat sel mikroba. Uji potensi antibakteri mempunyai tujuan mengukur aktivitas antibakteri dari suatu senyawa kimia terhadap bakteri. Tujuan pengukuran aktivitas antibakteri untuk menentukan potensi suatu zat yang diduga atau telah memiliki aktivitas sebagai antibakteri dalam larutan terhadap suatu bakteri (Jawetz *et al.* 2005).

## **F. Uji Aktivitas Antibakteri**

Uji aktivitas antibakteri suatu zat digunakan untuk mengetahui apakah zat tersebut dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri uji. Aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan berbagai metode, salah satunya yaitu metode difusi dan metode dilusi atau pengenceran.

### **1. Metode difusi**

Metode menggunakan piringan yang berisi agen antimikroba, kemudian diletakkan pada media agar yang sebelumnya telah ditanami mikroorganisme sehingga agen antimikroba dapat berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Pratiwi 2008).

Keuntungan metode difusi adalah dapat dengan mudah menentukan potensi antibakteri mengukur diameter zona radikal dan zona iradikal dibanding dengan metode dilusi yang pengamatannya sulit karena warna ekstrak sangat berpengaruh. Zona radikal adalah suatu daerah disekitar sumuran yang sama

sekali tidak terlihat pertumbuhan bakteri, sedangkan zona iradikal adalah daerah disekitar sumuran yang pertumbuhan bakterinya dihambat oleh zat antimikroba tetapi tidak dimatikan. Kekurangan metode ini adalah aktivitas antibakterinya dapat dipengaruhi oleh tebal tipisnya medium dan faktor difusibilitas obat karena suspensi bakteri tidak tersebar merata seperti metode dilusi (Jawetz *et al.* 1986).

## **2. Metode dilusi**

Metode dilusi digunakan untuk mengukur Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penanaman mikroba uji ataupun agen mikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi. 2008)

Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen mikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi 2008) dan memungkinkan didapatkannya hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah obat tertentu yang diperlukan untuk menghambat (atau membunuh) mikroorganisme yang diuji. Kekurangan metode dilusi yaitu hanya dapat digunakan untuk mengisolasi jenis organisme yang dominan dalam suatu populasi campuran (Jawetz *et al.* 2012).

## **G. Media**

Medium adalah suatu bahan nutrisi tempat menumbuhkan bakteri di laboratorium (Tortora *et al.* 2007). Media pertumbuhan mikroorganisme adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi berupa molekul-molekul kecil yang dirakit untuk menyusun komponen sel. Pada media pertumbuhan dapat dilakukan isolat mikroorganisme menjadi kultur murni dan juga memanipulasi komposisi media pertumbuhannya (Machmud 2008).

Media pembenihan harus dapat menyediakan energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri. Media harus mengandung sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfor dan faktor pertumbuhan organik (Radji 2010).

Berdasarkan kegunaannya media dapat dibedakan menjadi 3, yaitu media selektif, media diferensial, dan media diperkaya. Media selektif adalah media yang mengandung paling sedikit satu bahan yang dapat menghambat perkembangbiakan mikroorganisme yang tidak diinginkan dan membolehkan perkembangbiakan mikroorganisme tertentu yang ingin diisolasi. Media diferensial digunakan untuk menyeleksi suatu mikroorganisme dari berbagai jenis dalam suatu lempengan agar. Media diperkaya digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme yang diperoleh dari lingkungan alami karena jumlah mikroorganisme yang ada terdapat dalam jumlah yang sedikit (Irianto 2006). Berdasarkan konsistensinya dikelompokkan menjadi dua macam yaitu media cair (liquid media) dan media padat (solid media) (Pratiwi 2008).

## **H. Sterilisasi**

Sterilisasi merupakan suatu tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah kering, penggunaan sinar gelombang pendek seperti sinar-X, sinar  $\alpha$ , sinar gamma dan sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu dengan penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu dengan menggunakan saringan atau filter untuk bahan yang akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi. Bahan atau pelarut yang digunakan dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu atau merusak media atau mengganggu kehidupan dalam proses yang sedang dikerjakan (Suriawiria 2008).

Media yang digunakan dalam proses sterilisasi terlebih dahulu dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan cara dimasukkan kedalam oven pada suhu 170°C-180°C

selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan menggunakan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin (Hugo & Russel 2004). Lama waktu sterilisasi yang dibutuhkan bahan dipengaruhi oleh retensi mikroorganisme, dan enzim terhadap panas, kondisi pemanasan, pH bahan, ukuran wadah atau kemasan yang disterilkan serta keadaan fisik bahan (Machmud 2008).

### **I. Gentamisin**

Sebagian besar galur *Staphylococcus* sudah resisten terhadap berbagai antibiotik, seperti penicillin, metisilin, sefalosporin, eritromisin, linkomisin, dan rimpafisin, sehingga perlu diberikan antibiotik berspektrum luas seperti kloramfenikol, amoksisilin dan tetrasiklin (Jawetz *et al.* 2005).

Gentamisin merupakan antibiotik golongan aminoglikosida yang diisolasi dari *Micromonospora purpurea* yang efektif terhadap Gram positif dan Gram negatif. Selain gentamisin yang termasuk golongan aminoglikosida adalah streptomisin, kanamisin, neomisin, amikasin, tobramisin, netilmisin, dll. Saat ini, yang paling sering digunakan seperti gentamisin, tobramisin dan amikasin (Katzung *et al.* 2010).

Gentamisin memiliki potensi menengah. Aktivitasnya terhadap bakteri Gram positif cocci sangat baik. Dalam praktek umum, produksinya sering digunakan sebagai pilihan pertama. Gentamisin bersifat bakterisid. Pada mikroorganisme Gram positif, gentamisin efektif terutama terhadap *Staphylococcus* dan *Listeria* (Morris 2004).

### **J. Landasan Teori**

Infeksi adalah salah satu penyakit yang masih menjadi salah satu masalah dan terus berkembang dari waktu ke waktu. Contoh beberapa bakteri yang dapat menyebabkan infeksi diantaranya adalah *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* menyebabkan berbagai infeksi bernanah dan keracunan pada manusia (Radji 2010). Pengobatan terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* dapat menggunakan antibiotik golongan aminoglikosida. Salah satu golongan

aminoglikosida yang paling sering digunakan adalah gentamisin. Hal tersebut menjadi salah satu pertimbangan terhadap penggunaan gentamisin sebagai kontrol pembanding. Mekanisme kerja gentamisin, yaitu dengan menghambat sintesis protein dan menyebabkan kesalahan translokasi kode genetik (Hardjasaputra 2002).

Tingkat penggunaan antibiotik yang tinggi, semula tujuan awal diharapkan dapat memusnahkan bakteri penyebab infeksi, ternyata kini menimbulkan masalah baru yaitu timbulnya bakteri yang resisten sehingga mendorong para peneliti untuk mencari obat baru yang lebih efektif untuk penyakit infeksi. Mengingat kandungan khasiat tanaman obat yang sangat bermanfaat bagi kesehatan dan terbukti efektif, efisien, ekonomis, maka sudah saatnya jika pemanfaatan tanaman obat dioptimalkan (Wijayakusuma *et al.* 1992; Saepudin *et al.* 2007).

Tumbuhan bidara dikenal dengan nama latin *Zizyphus mauritiana* Lamk. merupakan tanaman yang memiliki banyak khasiat dalam pengobatan tradisional. Buah adalah sumber antioksidan yang baik dan digunakan secara tradisional di sariawan, sakit gigi, mual, diare, dan asites. Buah dari *Zizyphus mauritiana* Lamk. digunakan untuk berbagai keperluan *ethnomedical* pada asma, luka bakar, bisul, mual, muntah (Das 2012).

Penelitian sebelumnya terhadap bidara buah (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang telah dilakukan oleh Rathore *et al* (2012) menyatakan bahwa pada buah bidara ditemukan metabolit sekunder seperti flavonoid, glikosida, saponin, fenol, lignin, sterol dan tanin. Berbagai jenis metabolit sekunder yang ditemukan memiliki fungsi efektif pada berbagai jenis penyakit. Buah bidara dapat digunakan sebagai antimikroba dan antijamur.

Penelitian Das *et al* (2012) menyatakan bahwa ekstrak etanol buah *Zizyphus mauritiana* Lamk. pada konsentrasi 10 mg telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap *Staphylococcus aureus*. *Zizyphus mauritiana* Lamk. menunjukkan aktivitas antimikroba yang kuat dengan diameter hambat sebesar 14-15 mm.

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi secara maserasi kemudian fraksinasi untuk memperoleh kandungan zat aktif yang diperkirakan dapat berkhasiat sebagai antibakteri. Maserasi merupakan suatu penyarian zat aktif yang telah dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang sesuai selama lima hari pada suhu kamar terlindung dari cahaya, cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan didalam sel dengan diluar sel (Armanto 2009). Fraksinasi adalah suatu cara memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan polaritas (Harborne 1987).

Pengukuran aktivitas antibakteri pada penelitian ini dilakukan dengan metode difusi dan metode dilusi. Metode difusi adalah suatu pengukuran aktivitas antimikroba dengan menggunakan suatu lempeng kertas saring yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada permukaan medium padat yang telah diinokulasikan dengan organisme penguji dipermukaannya. Kemudian dilakukan pengukuran zona inhibisi jernih yang mengelilingi lempeng terhadap organisme penguji tersebut (Jawetz *et al.* 2012). Metode dilusi adalah suatu pengukuran aktivitas antibakteri terhadap suatu substansi antimikroba dalam kadar bertingkat yang dicampurkan ke dalam medium bakteriologis padat dan cair. Medium kemudian diinokulasikan dengan bakteri penguji dan diinkubasi. Titik akhir yang diambil adalah jumlah substansi antimikroba yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri penguji (Jawetz *et al.* 2012). Metode dilusi cair dilakukan dengan cara membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penanaman mikroba uji ataupun agen mikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi 2008)

### **K. Hipotesis**

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Kedua, dari ekstrak etanol dan ketiga fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) dari buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Ketiga, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) pada konsentrasi tertentu memiliki KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang diperoleh pada bulan Januari 2018 dari daerah Singaraja, Bali.

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

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang diambil secara acak dengan memilih buah yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, segar dan bersih.

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

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

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang menggunakan pelarut etanol 70% kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan *n*-heksana sebagai pelarut nonpolar, etil asetat sebagai pelarut semipolar, dan air sebagai pelarut polar.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

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

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

**2.1. Variabel bebas.** Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lam.) dengan berbagai konsentrasi.

**2.2. Variabel terkontrol.** Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kondisi laboratorium (antara lain: kondisi inkubasi, alat dan bahan yang digunakan harus steril), waktu pengamatan, waktu panen, tempat tumbuh tanaman, metode ekstraksi, dan fraksinasi.

**2.3. Variabel terikat.** Variabel terikat adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang dipengaruhi oleh fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.).

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang tidak terlalu tua muda dan tidak terlalu tua yang diperoleh dari Singaraja, Bali.

Kedua, serbuk buah bidara adalah buah bidara yang diambil kemudian dicuci pada air mengalir untuk membersihkan kotoran yang menempel setelah itu dikeringkan dalam alat pengering (oven) pada suhu 40°C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan no 40.

Ketiga, ekstrak etanol buah bidara adalah hasil ekstraksi buah bidara yang diekstraksi dengan larutan penyari etanol 70% menggunakan proses maserasi kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan dilanjutkan dengan fraksinasi.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah ekstrak dari etanol 70% buah bidara yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut nonpolar, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapat fraksi *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksinasi yang didapat dari lapisan air dari fraksi *n*-heksana yang kemudian difraksinasi dengan etil asetat sebagai pelarut semipolar, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah fraksinasi yang didapat dari lapisan air fraksi etil asetat yang kemudian difraksinasi dengan air sebagai pelarut polar, kemudian dipekatkan dengan *waterbath* sehingga didapat fraksi air.

Ketujuh, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode dilusi. Metode dilusi yaitu berupa seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi, yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,13%; 1,57%; 0,79%; 0,40%; 0,20%; 0,10%. Kontrol negatif adalah antibiotik gentamisin dan kontrol bakteri positif adalah suspensi bakteri.

Kesembilan, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terkecil yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri setelah diinokulasikan pada media.

### **C. Alat dan Bahan**

#### **1. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, ayakan nomor 40, lampu spiritus, timbangan analitik, kaki tiga, cawan petri, jarum ose, gelas ukur, Erlenmeyer, tabung reaksi, pipet tetes, pipet volume, pinset, beaker glass, botol cokelat, mikroskop, tissue, alat tulis, masker, corong kaca, batang pengaduk, corong pisah, autoklaf, evaporator, blender, kertas saring, kain flannel, *moisture balance*, inkubator, pinset, kapas lidi steril, chamber, *waterbath*, corong pisah.

#### **2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah bidara, bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pelarut yang digunakan untuk penyarian adalah etanol 70%. Media yang digunakan adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Vogel Johnson Agar* (VJA), dan *Muller Hinton Agar* (MHA). Bahan kimia yang digunakan adalah *n*-heksana, etil asetat, air, larutan Mayer, aquadestilata, DMSO 5%, HCl 2N, FeCl<sub>3</sub> 1%, larutan Dragendrof, kalium tellurit, hidrogen peroksida, asam asetat pekat, asam sulfat pekat, asam klorida pekat, asam sitrat, gentamisin

10 $\mu$ g, cat kristal violet, larutan lugol iodine, safranin, dan larutan standar Mc Farland 0,5.

#### **D. Jalannya Penelitian**

##### **1. Determinasi tanaman**

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman buah bidara dengan melakukan determinasi. Determinasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi meliputi daun, batang, bunga, akar dan buah pada tanaman buah bidara sesuai dengan kepustakaan dan dibuktikan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

##### **2. Pembuatan serbuk buah bidara**

Pembuatan serbuk buah bidara dilakukan dengan cara buah bidara dicuci dengan air mengalir guna membersihkan kotoran dan debu yang masih menempel. Buah bidara yang telah dicuci bersih dipotong-potong kemudian ditimbang, setelah itu di oven pada suhu 40°C. Buah bidara yang sudah kering dihaluskan kemudian diayak menggunakan pengayak nomor 40 sehingga diperoleh serbuk buah bidara yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen.

##### **3. Penetapan susut pengeringan serbuk buah bidara**

Penetapan susut pengeringan serbuk buah bidara menggunakan alat *moisture balance*. Suhu *moisture balance* diatur yaitu sebesar 105°C dan waktu pengeringan secara manual hingga kering kemudian dimasukkan neraca timbang dengan posisi 0,00 kemudian dimasukkan 2 gram serbuk buah bidara. Kadar air memenuhi syarat kadar air suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10% (Depkes 2000).

##### **4. Pembuatan ekstrak buah bidara**

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Langkah awal yang dilakukan adalah dimasukkan 10 bagian simplisia atau campuran simplisia dengan derajat halus yang cocok kedalam sebuah bejana, dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup, dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, dikerai, diperas, dicuci ampasnya

dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian (BPOM RI 2007). Semua hasil maserat dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (Kepmenkes 2009). Persen rendemen diperoleh dari menimbang hasil ekstrak kemudian dibagi serbuk buah bidara kering dan dikalikan 100%.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat (g)}}{\text{Berat serbuk buah bidara (g)}} \times 100\%$$

### 5. Tes bebas etanol ekstrak buah bidara

Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  pekat dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat kemudian dipanaskan. Uji positif bebas etanol ditandai dengan tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 2006).

### 6. Fraksinasi

Fraksinasi ekstrak buah bidara dibuat dengan menimbang ekstrak etanol hasil maserasi dalam beaker glass sebanyak 10 gram. Ekstrak etanol kental dari hasil maserasi di dalam beaker glass kemudian dilarutkan dengan pelarut air 75 ml, fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebanyak 3 kali dengan masing-masing 75 ml, fraksi *n*-heksana yang dapat dipekatkan. Residu yang diperoleh dari fraksi *n*-heksana dilanjutkan fraksinasi 3 kali dengan pelarut etil asetat masing-masing 75 ml. Hasil yang didapat adalah fraksi etil asetat yang dapat dipekatkan dengan *rotary evaporator*, dan fraksi air kemudian dipekatkan dengan *waterbath* sampai pekat lalu ditimbang (Depkes 1979).

### 7. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia bertujuan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam serbuk buah bidara. Identifikasi kandungan kimia dibuktikan di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

**7.1 Uji alkaloid.** Diambil sebanyak 0,5 gram ekstrak, lalu ditambahkan 1 ml HCl 2N, dipanaskan kemudian ditambahkan dengan larutan Mayer terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dan dengan Dragendrof terbentuk endapan berwarna coklat, kuning hingga jingga (Harborne 2006).

**7.2 Uji flavonoid.** Diambil sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring dan filtratnya ditambahkan 0,5 gram serbuk Mg, 1 mL HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol dan dikocok kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harborne 2006).

**7.3 Uji saponin.** Diambil sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit dalam tabung reaksi kemudian dikocok selama 10 detik dan diamkan selama 10 menit. Adanya saponin ditandai dengan dengan terbentuknya buih yang stabil (Harborne 2006).

**7.4 Uji tanin dan polifenol.** Diambil sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring, kemudian ditambahkan larutan FeCl<sub>3</sub>. Adanya tanin ditandai dengan terbentuknya biru atau hijau kehitaman. Adanya fenolik ditandai dengan terbentuknya warna hijau, merah ungu, biru atau hitam (Harborne 2006).

## **8. Sterilisasi**

Alat atau bahan yang digunakan harus dalam keadaan steril. Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Beaker glass dan gelas ukur disterilkan dengan oven pada suhu 170°C selama 30 menit, sedangkan alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung sedangkan inkas disterilkan menggunakan formalin (Suriawiria 2005).

## **9. Identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Pertama, identifikasi secara makroskopis. Bakteri murni diinokulasikan pada medium *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah ditetesi dengan kalium tellurit 1% dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan adanya warna koloni hitam dan warna medium disekitar koloni kuning, karena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat memfermentasi manitol menjadi suasana asam dan mereduksi tellurit menjadi metalik tellurit disekitar koloni yang berwarna hitam. Adanya fenol red maka medium disekitar koloni berwarna kuning. Hal ini disebabkan karena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat memfermentasi mannitol (Jawetz *et al.* 2007).

Kedua, pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dinyatakan positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati dibawah mikroskop. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara preparat ulas (smear) yang telah difiksasi, kemudian ditetesi Kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada kedua preparat sampai semua ulasan terwarnai dan didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan aquadest mengalir kemudian tetesi dengan lugol iodine (Gram B), didiamkan kurang lebih 1 menit kemudian dicuci lagi dengan aquadest mengalir dan keringkan, preparat dilunturkan dengan peluntur etanol:aseton 1:1 (Gram C) didiamkan selama 45 detik dan dicuci kembali dengan aquadest mengalir. Preparat dikeringkan dengan kertas tissue yang ditempelkan disisi ulasan kemudian didiamkan sampai mengering di udara dan ditutup dengan cat safranin (Gram D).

Ketiga, identifikasi biokimia. Identifikasi secara biokimia yaitu uji katalase dan koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada medium nutrient cair dengan penambahan 2 tetes hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 3%.  $H_2O_2$  akan terurai menjadi  $H_2$  dan  $O_2$ , hasil dinyatakan positif bila terlihat pembentukan gelembung udara disekitar koloni. Hal ini disebabkan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mempunyai enzim katalase (Jawetz *et al.* 2007).

Uji koagulase dapat menggunakan plasma darah dan diberi asam sitrat yang telah diencerkan (1:5) ditambah 1 ose biakan bakteri, diinkubasi pada suhu  $37^\circ C$ . Tabung diperiksa dengan melihat pembentukan selama 1-4 jam. Hasilnya positif kuat jika pada tabung tes dibalik, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung (Jawetz *et al.* 2007).

#### **10. Pembuatan suspensi bakteri uji**

Biakan murni bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Setia Budi Surakarta. Bakteri tersebut diambil dengan jarum ose steril dari biakan murni, kemudian disuspensikan pada media BHI (*Brain Heart Infusion*) dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu  $37^\circ C$ . Selanjutnya, diencerkan dengan larutan garam fisiologis sampai

kekeruhannya sama dengan larutan standar Mc. Farland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL). Hasil pengenceran tersebut disebut suspensi bakteri (CLSI 2015).

### **11. Pengujian aktivitas antibakteri buah bidara secara difusi**

Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari buah bidara yang diperoleh diuji secara mikrobiologi dengan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pengujian daya antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Setia Budi Surakarta. Metode yang digunakan adalah metode difusi menggunakan kertas cakram. Cawan petri yang telah diisi dengan media MHA sebanyak 30 mL. Bakteri diratakan pada media dalam cawan petri yang telah memadat dengan menggunakan kapas lidi steril secara aseptis. Larutan stok ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dibuat masing-masing tiga konsentrasi yaitu 50%, 25% dan 12,5% dengan menggunakan pelarut DMSO 5%. Dipipet 30  $\mu$ l larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air kemudian diteteskan dalam kertas cakram yang telah disterilkan dan didiamkan pada suhu kamar 10-20 menit. Kertas cakram yang telah dijenuhkan kemudian diletakkan pada media, sebagai kontrol positif diletakkan pula kertas cakram gentamisin. Sebagai kontrol negatif diletakkan pula kertas cakram yang telah ditetesi DMSO 5%. Replikasi dilakukan 3 kali. Masa inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan dilakukan pengamatan pengukuran zona hambat yang terbentuk. Konsentrasi pada difusi tersebut digunakan untuk mengetahui fraksi yang paling efektif.

### **12. Pengujian aktivitas antibakteri buah bidara secara dilusi**

Metode dilusi dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh bakteri uji. Metode ini menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 12 tabung steril dengan interval pengenceran dua kali secara aseptis.

Metode ini dilakukan dengan cara ekstrak dimasukkan dalam masing-masing tabung reaksi kecuali tabung sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Pembuatan larutan stok fraksi efektif buah bidara menggunakan pelarut DMSO 5%. Hal ini disebabkan karena Dimethyl sulfoxide (DMSO) merupakan salah satu pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar, nonpolar. Selain itu DMSO apabila digunakan dalam penelitian tidak akan mempengaruhi hasil penelitian karena pelarut tersebut tidak memiliki aktivitas antibakteri. Metode dilusi menggunakan

seri konsentrasi pengenceran mulai dari 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,13%; 1,57%; 0,79%; 0,40%; 0,20%; 0,10%. Kontrol positif menggunakan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada tabung terakhir dan kontrol negatif menggunakan ekstrak pada tabung pertama. Masukkan media BHI sebesar 0,5 mL pada tabung ke 2 sampai tabung ke 11 secara aseptis, kemudian masukkan larutan ekstrak sebanyak 1 mL pada tabung ke 1 dan larutan ekstrak sebanyak 0,5 mL pada tabung ke 2 dan dipipet sebanyak 0,5 dari tabung 2 dan dimasukkan dalam tabung 3 dan homogenkan hingga merata begitu seterusnya sampai tabung ke 11 lalu dibuang. Masukkan suspensi *Staphylococcus aureus* sebanyak 0,5 mL pada tabung ke 2 sampai tabung ke 11. Seluruh tabung diinkubasi selama 18-24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Tentukan KHM yaitu batas terendah tabung media yang jernih atau yang memberikan hasil negatif. Penentuan KBM dengan cara menginokulasikan sediaan dari tabung uji pada media VJA yang telah ditetesi 3 tetes kalium tellurit 1% dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media VJA yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

### **13. Identifikasi kandungan kimia secara KLT**

Ekstrak dan fraksi diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi yang dinyatakan paling aktif ditotolkan menggunakan pipa kapiler di atas lempeng kromatografi kemudian dielusikan dengan jarak pengembang (fase gerak) di dalam suatu bejana (chamber) yang didindingnya telah dilapisi dengan kertas saring sehingga atmosfer dalam bejana yang dijenuhi dengan fase gerak kemudian dilakukan elusi sampai fase gerak mencapai batas elusi. Fase diam yang digunakan adalah lempeng silika gel. Setelah pengembangan, lempeng kromatografi lapis tipis dikeringkan dan dilakukan deteksi dibawah sinar UV dan pereaksi lainnya. Bercak dideteksi kemudian ditentukan harga R<sub>f</sub> dan penampakan warnanya.

**13.1. Uji alkaloid.** Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menggunakan KLT dengan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase geraknya menggunakan toluen:etil asetat:dietilamin (7:2:1). Pereaksi semprot yang digunakan yaitu

Dragendrof yang akan menunjukkan bercak berwarna coklat jingga. Pada UV 366 nm, alkaloid akan berflouresensi biru, biru-hijau atau ungu (Wagner & Bladt 1996).

**13.2. Uji flavonoid.** Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menggunakan KLT dengan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dengan fase gerak *n*-heksana:etil asetat:asam formiat (6:4:0,2). Pereaksi semprot yang digunakan yaitu sitoborat yang akan menunjukkan bercak berwarna kuning atau kuning-coklat. Flavonoid akan berflouresensi biru, kuning atau hijau bila tanpa pereaksi dibawah UV 366 (Wagner & Bladt 1996).

**13.3. Uji saponin.** Identifikasi saponin dilakukan dengan menggunakan KLT. Fase gerak yang digunakan yaitu kloroform:metanol:air (13:7:2). Pereaksi pereaksi semprot yang digunakan anisaldehyd-asam sulfat pekat dengan pereaksi ini saponin membentuk bercak biru sampai violet, terkadang bercak berwarna merah, kuning, biru tua, ungu, hijau, atau berupa coklat kuning pada sinar tampak dan pada sinar UV 365 nm bercak tidak berfluoresensi (Wagner *et al.* 1996).

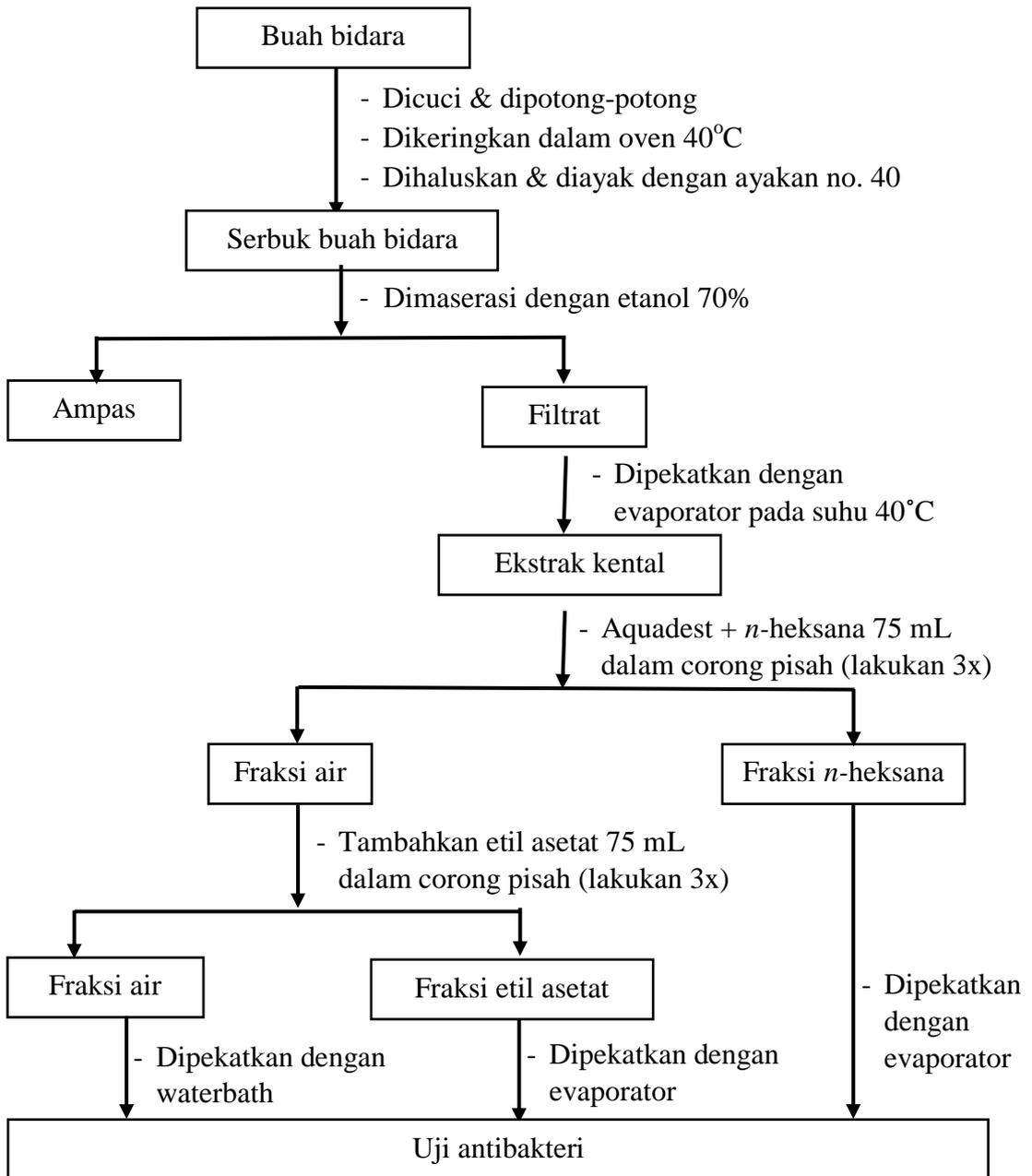
**13.4. Uji tanin dan polifenol.** Identifikasi tanin dilakukan dengan menggunakan KLT dengan menggunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana:etil asetat (3:7). Deteksi dilakukan dibawah UV 254 nm dan 366 nm tidak ada bercak. Pereaksi semprot yang digunakan FeCl<sub>3</sub> 1% (Depkes RI 2000). Pada fenolik menggunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak menggunakan kloroform:etil asetat:asam formiat (0,5:9:0,5). Melakukan deteksi dibawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm tidak ada bercak. Pereaksi semprot yang digunakan FeCl<sub>3</sub> 1 %. Hasil positif pada polifenol menunjukkan warna hitam (Marliana 2007).

## **E. Analisis data**

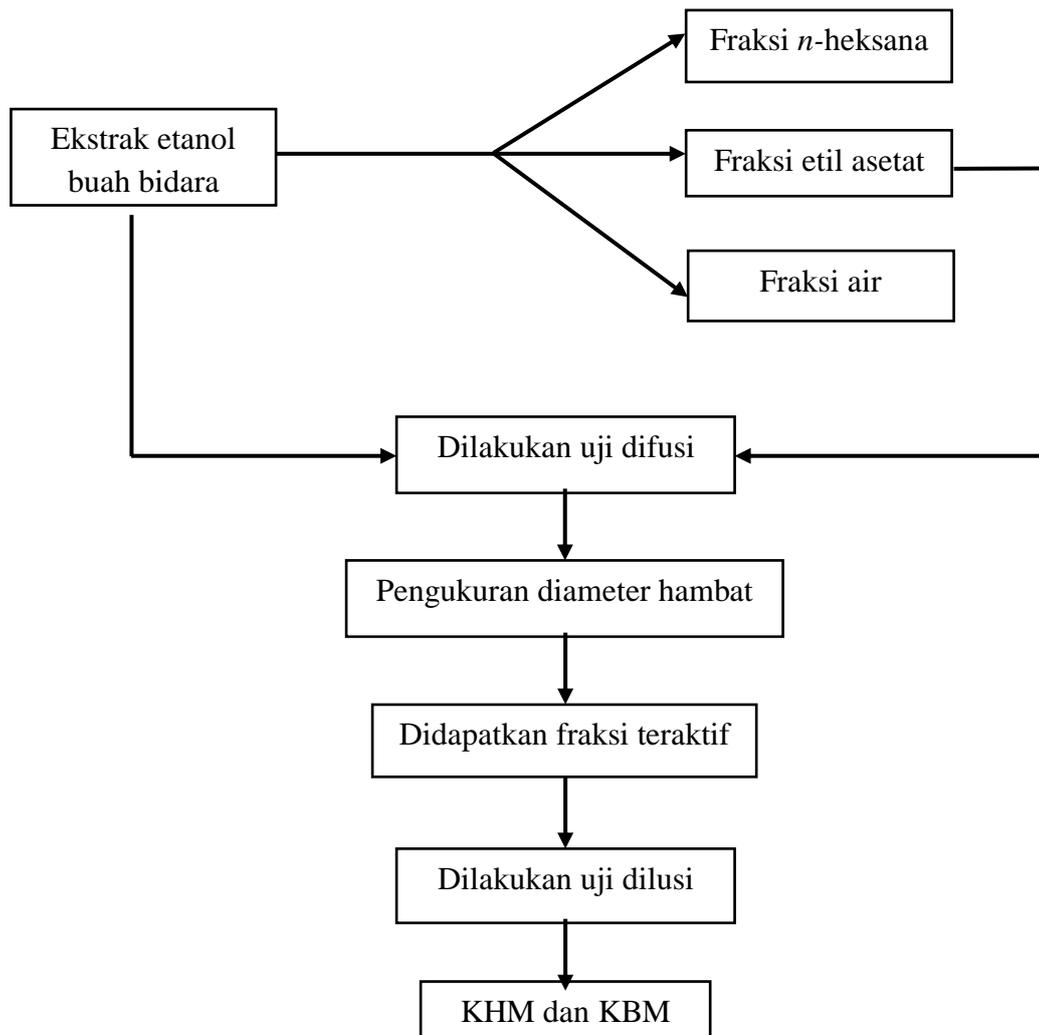
Analisa data aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol buah bidara dengan menggunakan *software* SPSS 17 pada konsentrasi yang sama untuk data hasil uji difusi. Metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilihat apakah data tersebut terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) atau tidak ( $p < 0,05$ ) dengan menggunakan uji distribusi normal

(*Kolmogorov-Smirnov*), jika data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA).

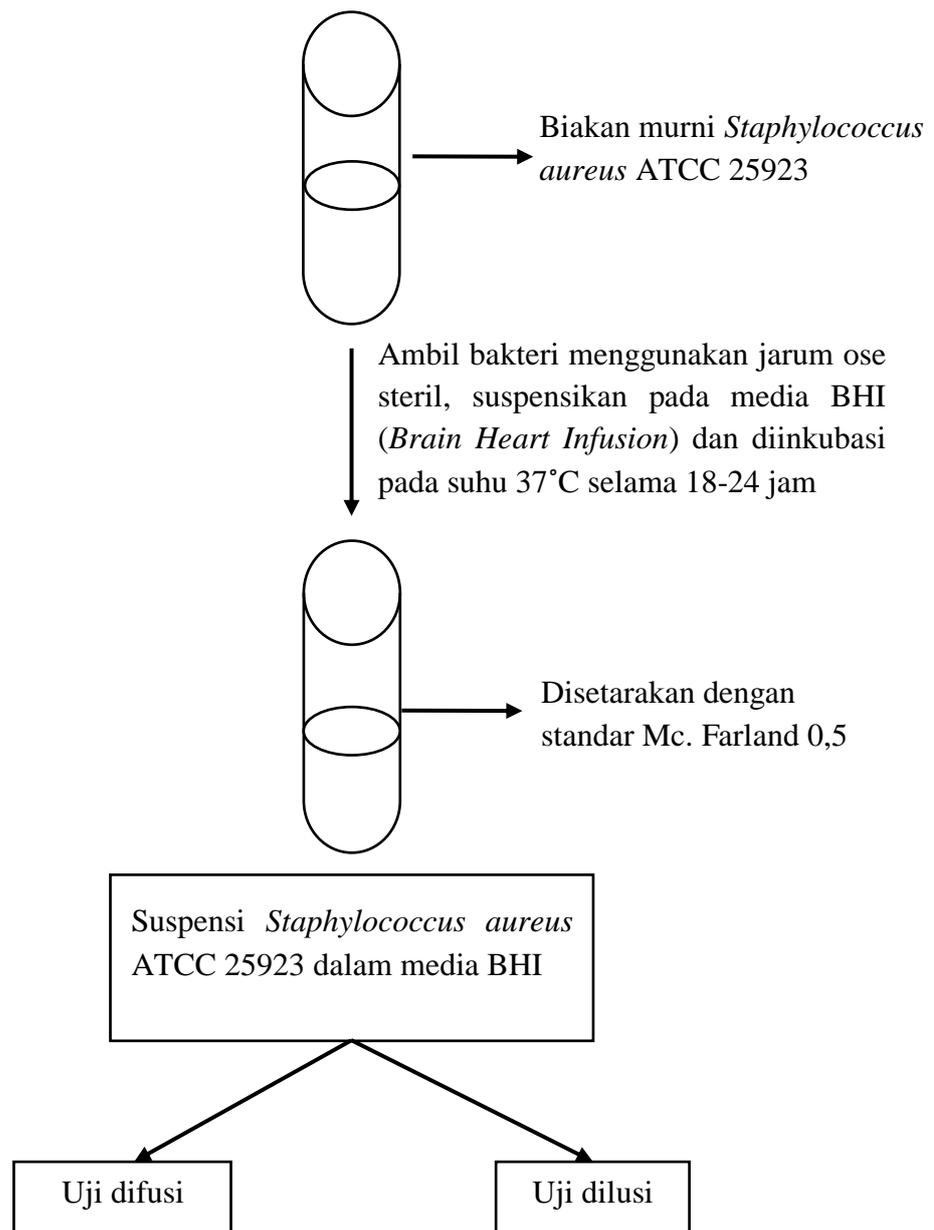
#### F. Skema Penelitian



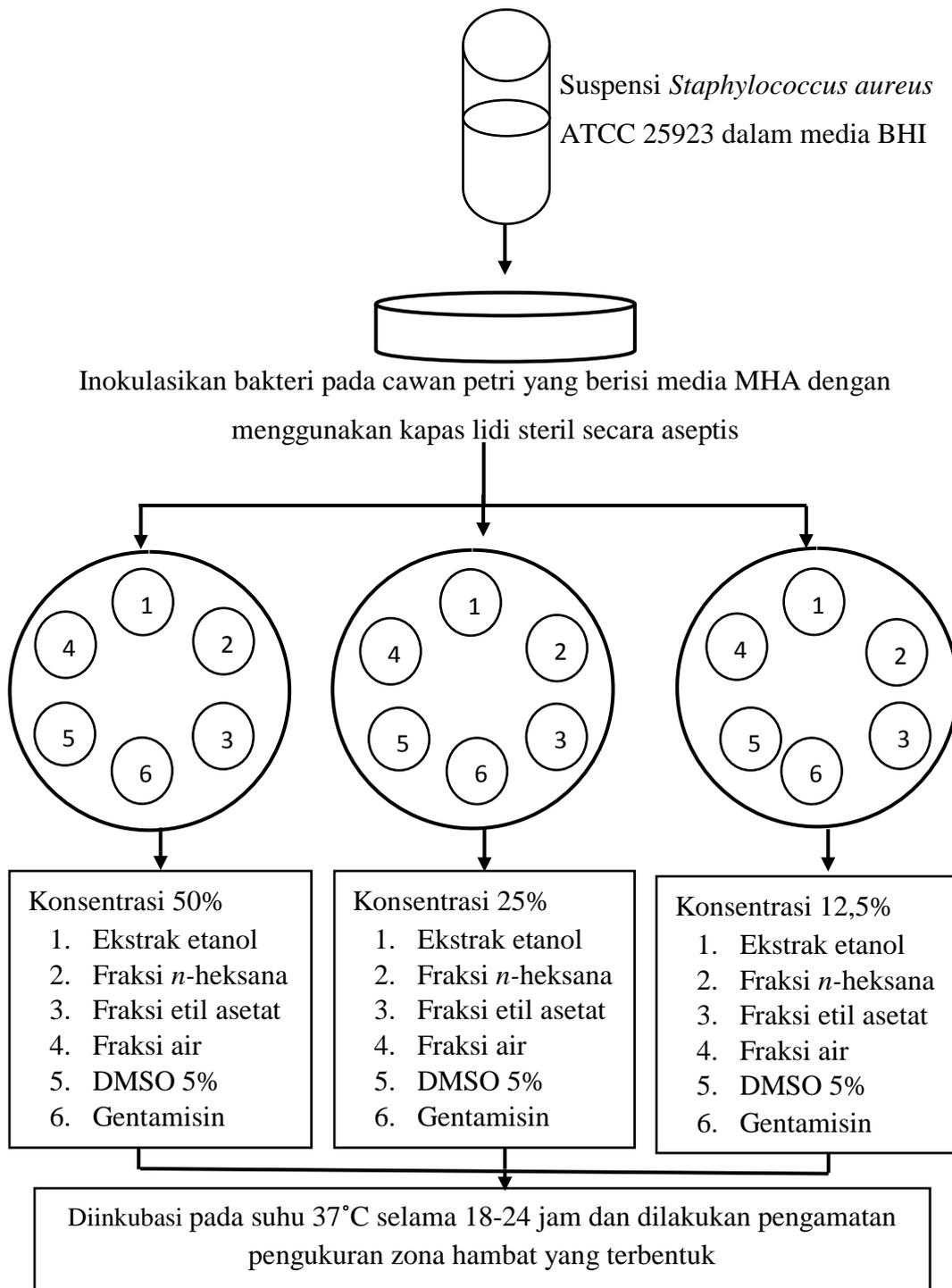
Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.).



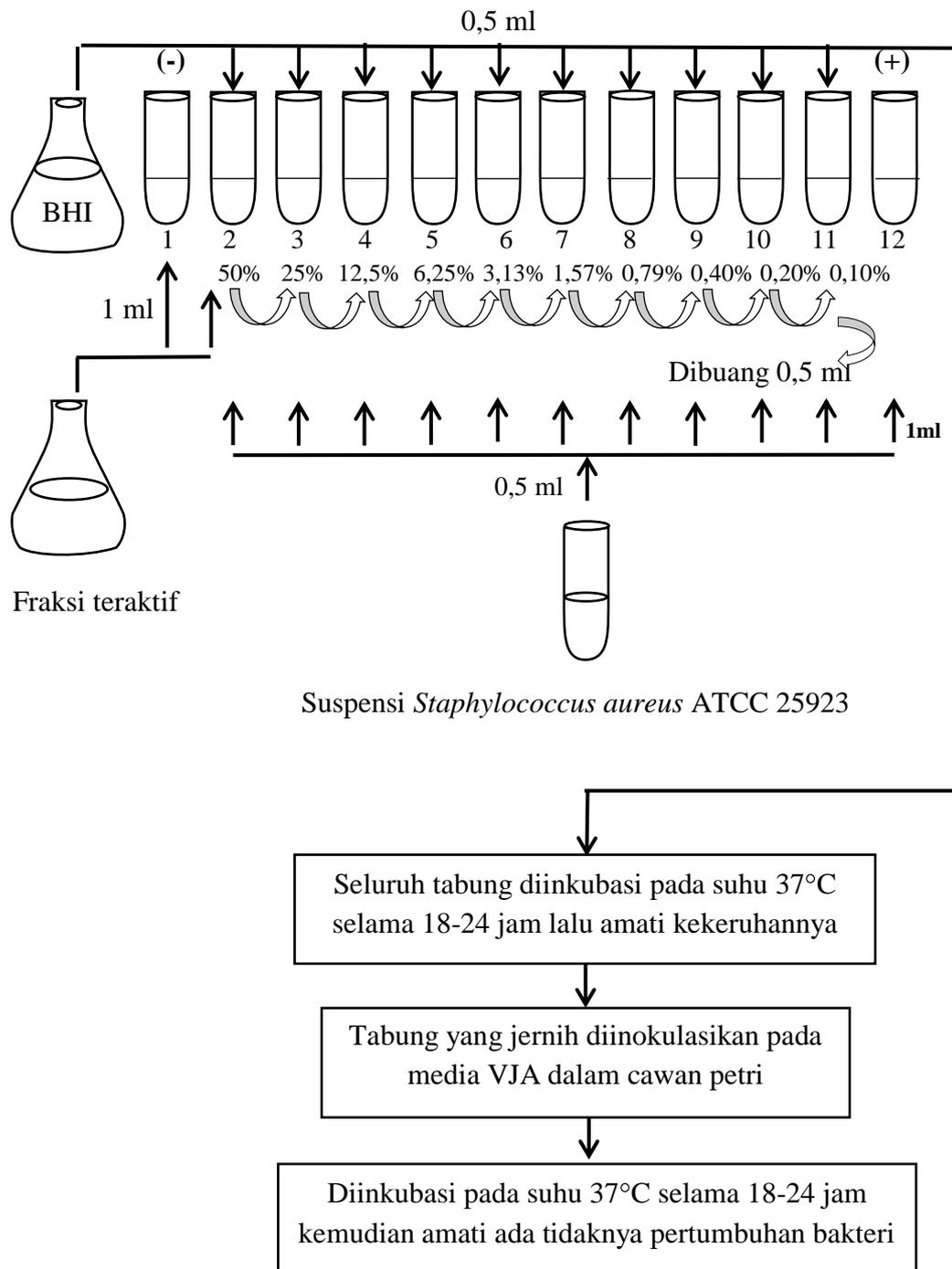
Gambar 4. Skema uji aktivitas antibakteri.



Gambar 5. Skema pembuatan suspensi bakteri.



**Gambar 6. Skema pengujian antibakteri dengan metode difusi terhadap bakteri.**



Gambar 7. Skema pengujian antibakteri dengan metode dilusi terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 1. Determinasi tanaman

Tanaman bidara yang digunakan dalam penelitian ini dideterminasi di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta. Determinasi ini dilakukan untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan dalam penelitian ini. Hasil determinasi berdasarkan : Steenis : FLORA

1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9b – 10b – 11b – 12b – 13b – 14a – 15a. golongan 8. 109b – 119b – 120b – 128b – 129b – 135b – 136b – 139b – 140b – 142b – 143b – 146a – 147b – 150b – 151a. familia 71. Rhamnaceae. 1. *Zizyphus*. 2. ***Zizyphus mauritiana Lamk.***

Berdasarkan hasil identifikasi diketahui bahwa benar tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman bidara (*Zizyphus mauritiana Lamk.*). Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

#### 2. Pembuatan serbuk buah bidara

Buah bidara yang telah dipisahkan dari bijinya kemudian dicuci bersih dengan air mengalir. Selanjutnya, dilakukan perajangan dan pengeringan. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, sehingga mencegah terjadinya pembusukan oleh jamur atau mikroorganisme lainnya dan mencegah terjadinya perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu. Pengeringan dilakukan dengan oven pada suhu 40°C. Buah bidara yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling. Serbuk diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh serbuk halus yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen. Pembuatan serbuk bertujuan agar memperluas permukaan partikel sehingga mempermudah kontak dengan pelarut pada saat penyarian sehingga hasil didapatkan optimal. Gambar pembuatan serbuk dapat dilihat pada lampiran 2.

**Tabel 1. Rendemen bobot kering terhadap bobot basah buah bidara**

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%) bb
10000	2100	21,00

Hasil rendemen bobot kering terhadap bobot basah buah bidara sebesar 21% b/b. Ekstrak yang dihasilkan berwarna coklat tua dan berbentuk kental. Hasil perhitungan persentase pengeringan buah bidara dapat dilihat pada lampiran 4.

### 3. Penetapan susut pengeringan serbuk buah bidara

Penetapan susut pengeringan serbuk buah bidara bertujuan untuk memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Penetapan susut pengeringan dilakukan untuk melihat zat-zat yang menguap yang ada dalam simplisia termasuk air. Kadar air yang terlalu tinggi dapat menyebabkan penurunan mutu atau kerusakan pada simplisia. Penetapan susut pengeringan serbuk buah bidara dilakukan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*.

**Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk buah bidara**

No	Bobot awal (gram)	Bobot akhir (gram)	Kadar susut pengeringan (%)
1	2,00	1,87	5,4
2	2,00	1,89	5,7
3	2,00	1,87	5,5
Rata-rata			5,5

Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan serbuk buah bidara sebesar 5,5%. Hasil ini menunjukkan bahwa kadar serbuk buah bidara memenuhi parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat, dimana kadar diperoleh kurang dari 10%.

### 4. Pembuatan ekstrak etanol buah bidara

Pembuatan ekstrak etanol dari buah bidara dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk buah bidara yang dibutuhkan untuk pembuatan ekstrak sebanyak 800 gram simplisia dan didapatkan hasil ekstrak kental sebanyak 270 gram.

**Tabel 3. Pembuatan ekstrak etanol buah bidara**

Serbuk buah bidara (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%) b/b
800	270	33,75

Hasil dari maserasi buah bidara didapatkan ekstrak kental sebanyak 270 gram. Presentase rendemen ekstrak maserasi buah bidara diperoleh sebesar

33,75%. Ekstrak tersebut kemudian dilakukan fraksinasi dengan *n*-heksana, etil asetat dan air. Hasil perhitungan rendemen ekstrak etanol buah bidara dapat dilihat pada lampiran 5.

### 5. Tes bebas etanol ekstrak buah bidara

Ekstrak dari buah bidara dilakukan uji bebas etanol dengan melakukan uji esterifikasi alkohol. Tes bebas etanol bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung alkohol sehingga tidak mengganggu aktivitas antibakteri dari ekstrak buah bidara. Ekstrak yang sudah bebas dari alkohol dapat dilanjutkan ke tahap fraksinasi.

**Tabel 4. Tes bebas etanol dari ekstrak buah bidara**

Hasil	Pustaka
Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol	Tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol

Hasil tes bebas etanol menunjukkan bahwa ekstrak buah bidara sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 70% yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol. Hasil tes bebas etanol dapat dilihat pada lampiran 6.

### 6. Fraksinasi

Ekstrak kental yang telah diperoleh dari metode maserasi dilakukan fraksinasi dengan menggunakan tiga pelarut, yaitu pelarut nonpolar (*n*-heksana), pelarut semipolar (etil asetat), dan pelarut polar (air).

**6.1 Fraksinasi *n*-heksana.** Ekstrak buah bidara dilakukan fraksinasi dengan pelarut nonpolar (*n*-heksana) dengan menggunakan corong pisah. Fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan pelarut *n*-heksana sebanyak 75 mL, kemudian hasil fraksi *n*-heksana diuapkan. Residu yang diperoleh dilakukan ekstraksi lanjutan menggunakan pelarut etil asetat. Hasil fraksinasi dapat dilihat pada lampiran 7.

**Tabel 5. Rendemen fraksi *n*-heksana buah bidara**

Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen % (b/b)
120	4,17	3,48

Berdasarkan tabel diatas dapat dilihat bahwa perhitungan presentase rendemen fraksi *n*-heksana buah bidara rata-rata sebesar 3,48%. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana buah bidara dapat dilihat pada lampiran 8.

**6.2 Fraksinasi etil asetat.** Residu yang diperoleh dari hasil fraksi *n*-heksana buah bidara dilakukan fraksinasi sebanyak 3 kali menggunakan pelarut etil asetat masing-masing sebanyak 75 mL, kemudian hasil fraksi etil asetat diuapkan. Residu yang diperoleh dilakukan pemekatan. Rendemen hasil fraksi etil asetat dapat dilihat pada tabel 6.

**Tabel 6. Rendemen fraksi etil asetat**

Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen % (b/b)
120	7,81	6,50

Berdasarkan tabel diatas dapat dilihat bahwa perhitungan presentase rendemen fraksi etil asetat buah bidara rata-rata sebesar 6,50%. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana buah bidara dapat dilihat pada lampiran 9.

**6.3 Fraksinasi air.** Residu yang diperoleh dari hasil fraksi etil asetat buah bidara dilakukan pemekatan menggunakan waterbath sehingga diperoleh fraksi air. Rendemen hasil fraksi air dapat diilihat pada tabel 7.

**Tabel 7. Rendemen fraksi air**

Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen % (b/b)
120	104,64	87,20

Berdasarkan tabel diatas dapat dilihat bahwa perhitungan presentase rendemen fraksi air buah bidara rata-rata sebesar 87,20%. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana buah bidara dapat dilihat pada lampiran 10.

## 7. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia ini dilakukan uji senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan polifenol. Hasil pengujian kandungan kimia dapat dilihat pada tabel 8.

**Tabel 8. Hasil uji kandungan kimia serbuk, ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air buah bidara**

Senyawa	Pustaka	Interpretasi hasil				
		Serbuk	Ekstrak	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
Alkaloid	Uji positif ditandai dengan penambahan Dragendrof terbentuk endapan berwarna coklat, kuning hingga jingga (Harborne 2006).	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Flavonoid	Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harborne 2006).	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
Saponin	Uji positif ditandai dengan terbentuknya buih mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Depkes 2006).	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
Tanin	Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman (Harborne 2006).	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
Polifenol	Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau, merah ungu, biru atau hitam (Harborne 2006).	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)

**Keterangan :** (+) : mengandung golongan senyawa

(-) : tidak mengandung golongan senyawa

Hasil identifikasi kandungan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa serbuk dan ekstrak dari buah bidara mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan polifenol. Hasil identifikasi senyawa fraksi *n*-heksana buah bidara mengandung senyawa alkaloid. Fraksi etil asetat mengandung senyawa kimia alkaloid, flavonoid, tanin dan polifenol, sedangkan fraksi air mengandung

senyawa flavonoid, saponin, tanin, dan polifenol. Gambar hasil identifikasi senyawa dapat dilihat pada lampiran 10.

### **8. Identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Hasil identifikasi biakan murni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang digoreskan pada medium VJA yang sudah ditambahkan kalium tellurit kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Berdasarkan pengamatan, koloni yang dihasilkan berwarna hitam dan medium disekitar koloni berwarna kuning. Koloni yang berwarna hitam ini disebabkan karena *Staphylococcus aureus* memiliki kemampuan mereduksi kalium tellurit menjadi metalik tellurit. Warna disekitar koloni berwarna kuning karena *Staphylococcus aureus* dapat memfermentasi manitol menjadi asam. Fermentasi manitol dideteksi oleh perubahan warna indikator phenol red dari merah menjadi kuning (Jawetz 2012). Gambar hasil identifikasi secara makroskopis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada lampiran 12.

Hasil pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan hasil koloni berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur. Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengamati morfologi sel bakteri dan mengetahui kemurnian sel bakteri. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk kokus yang menghasilkan warna ungu pada pewarnaan Gram. Warna ungu disebabkan karena *Staphylococcus aureus* mempertahankan warna ungu dari kristal violet sehingga ketika diamati menggunakan mikroskop akan menunjukkan warna ungu (Jawetz 2012). Gambar hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada lampiran 12.

Hasil identifikasi biokimia *Staphylococcus aureus* meliputi uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya buih atau gelembung udara setelah koloni ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uji katalase bertujuan untuk membedakan antara *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, dimana kelompok *Staphylococcus* bersifat katalase positif. Katalase merupakan enzim yang mengkatalisa penguraian hidrogen peroksida menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub>. Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini menginaktifkan enzim dalam sel. Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga

mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob pasti menguraikan bahan tersebut (Jawetz 2012). Gambar hasil uji katalase dapat dilihat pada lampiran 12.

Hasil uji koagulase menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya gumpalan putih. Uji koagulase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim koagulase. Koagulase merupakan protein ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* yang dapat mengkoagulasi plasma. Reaksi *clumping factor* (pengumpulan) antara *Staphylococcus aureus* dengan fibrinogen yang terdapat dalam serum. Reaksi tersebut ditunjukkan dengan adanya gumpalan koagulase (Jawetz *et al.* 2007). Gambar hasil uji koagulase dapat dilihat pada lampiran 12.

### **9. Pembuatan suspensi bakteri uji**

Hasil dari pembuatan suspensi dilihat kemudian dibandingkan kekeruhannya dengan standar Mc Farland ( $10^8$  CFU/mL) *Staphylococcus aureus*. Suspensi yang terbentuk tersebut disebut suspensi bakteri (CLSI 2015). Hasil pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada lampiran 13.

### **10. Pengujian aktivitas antibakteri buah bidara secara difusi**

Ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari buah bidara dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pengujian aktivitas antibakteri ini menggunakan metode difusi. Metode difusi bertujuan membandingkan hasil yang paling efektif dalam satu cawan petri. Larutan stok dibuat dalam tiga konsentrasi yaitu 50%, 25% dan 12,5%. Pelarut dan kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5%. Kontrol positif yang digunakan adalah Gentamisin. Kontrol positif digunakan sebagai standar untuk melihat dan membandingkan kemampuan penghambatan ekstrak dan fraksi buah bidara.

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi menggunakan metode difusi dengan waktu inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Daya antibakteri ekstrak dan fraksi buah bidara dapat dilihat dari adanya area jernih disekitar cakram (disk).

**Tabel 9. Diameter hambatan pada uji antibakteri buah bidara terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi**

Sampel	Konsentrasi	Diameter hambatan (mm)			Rata-rata $\pm$ SD
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	50 %	10	10	9	9,67 $\pm$ 0,58
	25 %	10	9	7	8,67 $\pm$ 1,53
	12,5 %	7	8	6	7,00 $\pm$ 1,00
Fraksi <i>n</i> -heksana	50 %	9	9	8	8,67 $\pm$ 0,58
	25 %	8	8	6	7,33 $\pm$ 1,15
	12,5 %	6	8	6	6,67 $\pm$ 1,15
Fraksi etil asetat	50 %	15	19	22	18,67 $\pm$ 3,51
	25 %	12	14	15	13,67 $\pm$ 1,52
	12,5 %	11	10	12	11,00 $\pm$ 1,00
Fraksi air	50 %	9	11	13	11,00 $\pm$ 2,00
	25 %	8	9	10	9,00 $\pm$ 1,00
	12,5 %	6	8	7	7,00 $\pm$ 1,00
Gentamisin	10 $\mu$ g	20	25	22	22,33 $\pm$ 2,52
DMSO	5 %	0	0	0	0 $\pm$ 0

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah bidara dengan metode difusi menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Berdasarkan tabel 9 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai daya hambatan yang paling besar terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan dengan ekstrak, fraksi *n*-heksana, dan fraksi air. Hasil rata-rata diameter daya hambatan fraksi etil asetat konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% berturut-turut adalah 18,67 mm, 13,67 mm, dan 11,00 mm, sedangkan gentamisin sebagai kontrol positif rata-rata sebesar 22,33 mm. Kontrol negatif yaitu DMSO 5% tidak memiliki daya hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. DMSO merupakan salah satu pelarut sampel yang dapat melarutkan hampir semua senyawa, baik polar maupun nonpolar. DMSO tidak memberikan pengaruh dalam aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji, sehingga dapat digunakan untuk melarutkan

ekstrak dan fraksi dari buah bidara. Gambar hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 14.

Analisis data menggunakan *Analisis of Varians* (ANOVA) *Two Way*. Uji *Kolmogorov-Smirnov* diperoleh signifikansi  $0,85 > 0,05$  ( $H_0$  diterima), sehingga dapat disimpulkan data terdistribusi normal dan dapat dilakukan uji *Analisis of Varians* (ANOVA) *Two Way*. ANOVA *Two Way* dilakukan untuk membandingkan perbedaan diameter hambat dari tiap konsentrasi antara ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, air, kontrol negatif, dan kontrol positif. Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* dapat dilihat pada lampiran 20.

Tabel *Homogeneous Subsets* bertujuan untuk melihat kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* terbagi menjadi 5 subset semakin ke arah kanan semakin besar diameter hambatnya. Subset 1 terdapat kontrol negatif yaitu DMSO 5%. Subset 2 terdapat ekstrak dan fraksi *n*-heksana. Subset 3 terdapat ekstrak dan fraksi air. Subset 4 terdapat fraksi etil asetat. Subset 5 terdapat kontrol positif yaitu gentamisin. Hasil tersebut menunjukkan bahwa antara subset 1 sampai subset 5 mempunyai beda yang nyata dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Tabel *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada lampiran 20.

Fraksi etil asetat mempunyai aktivitas terbesar dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan dengan ekstrak, fraksi *n*-heksana, dan air. Fraksi etil asetat mampu menarik senyawa seperti alkaloid, flavonoid, tanin dan polifenol. Senyawa alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri karena dapat mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri. Peptidoglikan merupakan komponen penyusun dinding sel bakteri sehingga adanya gangguan tersebut akan menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel. Senyawa flavonoid bersifat antibakteri melalui 3 mekanisme, yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel, dan menghambat metabolisme (Rahman *et al.* 2017). Senyawa tanin bekerja pada sistem sintesis DNA yaitu dengan menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Nuria *et al.* 2009). Tanin merupakan

kelompok senyawa polifenol yang memiliki aktivitas antibakteri. Mekanisme tanin sebagai antibakteri diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri, akibat terganggunya permeabilitas, sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Ajizah 2004).

### 11. Pengujian aktivitas antibakteri buah bidara secara dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilanjutkan dengan pengujian menggunakan metode dilusi dari sediaan uji yang paling efektif dalam menghambat aktifitas antibakteri dari hasil uji difusi yaitu fraksi etil asetat. Uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi dilakukan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,57%, 0,79%, 0,40%, 0,20%, 0,10% serta kontrol (+), dan kontrol negatif (-). Kontrol positif menggunakan suspensi bakteri dan kontrol negatif menggunakan fraksi etil asetat.

**Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri secara dilusi**

No	Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat		
		Replikasi		
		1	2	3
1	K (-)	-	-	-
2	50	-	-	-
3	25	-	-	-
4	12,5	-	-	-
5	6,25	-	-	-
6	3,13	-	-	-
7	1,57	+	+	+
8	0,79	+	+	+
9	0,40	+	+	+
10	0,20	+	+	+
11	0,10	+	+	+
12	K (+)	+	+	+

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilihat dari kejernihan pada tabung yang menunjukkan bahwa pada konsentrasi tertentu dapat menghambat

pertumbuhan bakteri. Konsentrasi terendah larutan uji yang terlihat jernih dapat ditentukan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada penelitian ini tidak dapat ditentukan karena tertutupi oleh kekeruhan. Nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan diinokulasikan dari tabung pada media VJA dalam cawan petri. Nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilihat dari ada tidaknya pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada media VJA. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) merupakan konsentrasi terendah yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri. Nilai KBM diperoleh pada konsentrasi 3,13% yang merupakan konsentrasi terendah dari fraksi etil asetat yang dapat membunuh pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi dapat dilihat pada tabel 10. Gambar hasil uji aktivitas antibakteri secara dilusi dapat dilihat pada lampiran 16.

## **12. Identifikasi kandungan kimia secara KLT**

Identifikasi kandungan kimia secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui beberapa senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi buah bidara. Fase diam menggunakan lempeng silika gel.

Identifikasi KLT senyawa alkaloid menunjukkan hasil positif jika pada penyemprotan dengan pereaksi Dragendrof akan menunjukkan bercak berwarna coklat jingga. Pada UV 366 nm, alkaloid akan berflouresensi biru, biru-hijau atau ungu bila tanpa pereaksi. Hasil uji KLT pada ekstrak dan fraksi buah bidara menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi *n*-heksana, dan fraksi etil asetat positif mengandung senyawa alkaloid yang ditunjukkan dengan adanya bercak biru-kehijauan pada UV 366 dan berwarna coklat setelah penyemprotan dengan pereaksi Dragendrof. Bercak-bercak yang terbentuk kemudian dilingkari dengan pensil dan dihitung nilai Rf.

Identifikasi KLT senyawa Flavonoid menunjukkan hasil positif jika pada penyemprotan dengan sitoborat menunjukkan warna kuning atau kuning-coklat dan pada UV 366 akan berflouresensi biru, kuning atau hijau bila tanpa pereaksi. Hasil uji KLT pada ekstrak dan fraksi buah bidara menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi etil asetat, dan fraksi air positif mengandung senyawa flavonoid yang

ditunjukkan dengan bercak berwarna coklat setelah penyemprotan dengan sitoborat dan berwarna kuning pada UV 366. Bercak-bercak yang terbentuk kemudian dilingkari dengan pensil dan dihitung nilai Rf.

Identifikasi KLT senyawa saponin menunjukkan hasil positif jika pada penyemprotan dengan anisaldehyd-asam sulfat pekat akan menunjukkan bercak berwarna biru sampai violet, terkadang berwarna merah, kuning, biru tua, ungu, hijau, atau berupa coklat pada sinar tampak dan pada UV 365 bercak tidak berflouresensi. Hasil uji KLT pada ekstrak dan fraksi buah bidara menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi air positif mengandung senyawa saponin yang ditunjukkan dengan adanya bercak berwarna coklat pada sinar tampak. Bercak-bercak yang terbentuk kemudian dilingkari dengan pensil dan dihitung nilai Rf.

Identifikasi KLT senyawa tanin menunjukkan hasil positif jika pada UV 254 nm dan 366 nm setelah penyemprotan dengan  $\text{FeCl}_3$  1% akan tidak menunjukkan adanya bercak. Senyawa polifenol menunjukkan hasil positif jika setelah penyemprotan dengan  $\text{FeCl}_3$  1 % berwarna hitam. Hasil uji KLT pada ekstrak dan fraksi buah bidara menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi etil asetat, dan fraksi air positif mengandung tanin dan polifenol. Bercak-bercak yang terbentuk kemudian dilingkari dengan pensil dan dihitung nilai Rf.

Data yang diperoleh dari KLT adalah nilai Rf yang bertujuan untuk identifikasi senyawa. Nilai Rf dari senyawa dapat dibandingkan dengan nilai Rf dari senyawa standar. Nilai Rf dapat didefinisikan dengan jarak yang ditempuh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh pelarut. Nilai Rf selalu lebih kecil dari 1. Hasil KLT menunjukkan pemisahan dan kenaikan bercak yang bervariasi. Pemisahan yang terbaik dalam KLT memiliki ciri yaitu terbentuknya bercak yang banyak dan terpisah dengan jelas. Hasil KLT dan perhitungan Rf dapat dilihat pada lampiran 18 dan 19.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari buah bidara memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25935.

Kedua, yang paling efektif dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25935 adalah fraksi etil asetat konsentrasi 50% dengan diameter hambat sebesar 18,67 mm.

Ketiga, fraksi etil asetat dari buah bidara memiliki Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25935 sebesar 3,13%.

#### **B. Saran**

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas antibakteri buah bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap bakteri lain.

Kedua, perlu dilakukan uji antibakteri buah bidara dengan menggunakan pelarut dan metode penyarian yang lain untuk mengetahui yang lebih efektif.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina S. 2015. Peningkatan Resistensi Kultur Bakteri *Staphylococcus Aureus* Terhadap *Amoxicillin* Menggunakan Metode Adatif Gradual. *Jurnal Farmasi Indonesia* 7:3
- Agustrina G. 2011. Potensi Propolis Lebah Madu apis *Mellifera Spp* sebagai Bahan Antibakteri [Skripsi]. Bogor: Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Ajizah A. 2004 Sensitivitas *Salmonella Typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun *Psidium Guajava L. Bioscientiae*. 1:31-8
- Armanto R. 2009. *Memproduksi Minyak Atsiri Berkualitas*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Ayuningtyas AK. 2008. Efektifitas Campuran Meniran *Phyllanthus niruri* dan Bawang Putih *Allium sativum* untuk Pengendalian Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo *Clarias gariepenus* [Skripsi]. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- [BPOM RI] Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2007. *Acuan Sediaan Herbal Volume Ketiga*. Jakarta: Direktorat OAI.
- CLSI. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Das S. 2012. Antimicrobial and antioxidant activities of green and ripe fruits of *Averrhoa carambola* Linn. and *Ziziphus mauritiana* Lam. *Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research*. 5:102–105.
- Dahiru D, Sini JM, John AL. 2006. Antidiarrhoeal activity of *Ziziphus mauritiana* root extract in rodents. *African Journal of Biotechnology* 5:941-945.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. *Materia Medika Indonesia*. Jilid III Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1989. *Materi Medika Indonseia* Jilid VI. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Dianasari N. 2009. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae* serta Bioautigrafinya [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah.
- Endang SL, Severin JA. 2009. *Antimicrobial Resistance in Indonesia: Prevalence, determinants and genetic basis*. Erasmus MC: University Medical Center Rotterdam.
- Endarini LH. 2016. *Farmakognisi dan Fitokimia*. Jakarta: Pusdik SDM Kesehatan hlm 92, 119, 135, 144-145.
- Gaur, Sharma GN. 2013. *Ziziphus mauritiana* Lam-An Overview. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* 3:2231-6876.
- Guntur A. 2007. The Role of Cefepime Empirical Treatment in Critical Illness. *Dexa Media Jurnal Kedokteran dan Farmasi* 2.
- Goyal M, Nagori BP, Sasmal D. 2012. Review on ethnomedicinal uses, pharmacological activity and phytochemical constituents of *Ziziphus mauritiana* (*Z. jujuba* Lam., non Mill). *Spatula DD* 2:107-116.
- Harborne JB. 1987. *Motode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Kosasis P, Iwang S. Penerjemah; Sofia N, editor: Bandung:ITB. Terjemahan dari *Pythochemicals Methods*.
- Harborne JB. 2006. *Motode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Kosasis P, Iwang S. Penerjemah; Bandung:ITB. Terjemahan dari *Pythochemicals Methods*.
- Hardjasaputra P, Budipornoto G, Sembiring, Kamil I. 2002. *Data Obat di Indonesia Edisi 10*. Grafidian Medipress: Jakarta.
- Heyne K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid III*. Jakarta: Balai Penelitian dan Pengembangan Kehutanan.
- Hugo WB, Russel AD 2004. *Pharmaceutical Microbiology Seventh Edition*. Blackwell Science.
- Irianto K. 2006. *Mikrobiologi*. Bandung: Yrama Widya.
- Iskamto B. 2009. *Bakteriologi Kesehatan*. Editor: Harti AS. Sebelas Maret University Press: Surakarta.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1986. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan*. Jakarta: EGC Penerbit Buku Kedokteran

- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2007. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan*. Bonang G, penerjemah; Jakarta:EGC. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Ed ke-25. Penerjemah: Aryandhito WN, Dian R. Jakarta: EGC. Hlm 74, 194-197, 362.
- Jayanegara A, Sofyan A. 2008. Penentuan Aktivitas Biologis Tanin Secara In Vitro Menggunakan Hohenheim Gas Test Dengan Polietilen Glikol Sebagai Determinan. *Media Peternakan* 31:1.
- [KEPMENKES RI] Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia. 2009. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi Pertama*. Jakarta
- Khopkar SM. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Saptorahardjo A, Penerjemah. Jakarta:UI Press.
- Lim, T. K. (2013): *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants:Fruits*. Volume 2. London:Springer.
- List PH, Schmidt PC. 2000. *Phytopharmaceutical Technology*. German:Institute of Pharmaceutical Technology. University of Marburg.
- Machmud M. 2008. *Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikrob*.Bogor:Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan.
- Marliana E. 2007. Analisa senyawa metabolit sekunder dari batag *Spatholobus ferrungineus* (Zoll & Moritzi) Benth yang berfungsi sebagai antioksidan. *Jurnal Penelitian MIPA* 1:1.
- Morris DO. 2004. Medical Therapy of Otitis Externa and Otitis Media. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 34:541-555.
- Nurhalimah H, Wijayanti N, Widyaningsih TD. 2011 Efek Antidiare Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea Indica L.*) terhadap Mencit Jantan yang Diinduksi Bakteri *Salmonella Thypimurium*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3:3.
- Nuria MC, Faizatun A, Sumantri. 2009. Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas L*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian*. 5: 26-37

- Parmar P, Bhatt S, Dhyani S, Jain A. 2012. Phytochemical studies of the secondary metabolites of *Ziziphus mauritiana* Lam. Leaves. *International journal of current pharmaceutical research* 4:153-155.
- [PERMENKES RI] Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Pedoman Pencegahan Dan Pengendalian Infeksi Di Fasilitas Pelayanan Kesehatan*. Jakarta: Menteri Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 125
- Pratiwi, ST 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Yogyakarta: Penerbit Erlangga. Hlm 116, 188-191
- Praeparandi. 2006. *Card System Analisa Kimia Farmasi Kualitatif*. Bandung: Seksi Diklat Stenth.
- Radji M. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*, Jakarta: EGC. Hlm 27, 107, 180-186, 223.
- Rahman FA, Haniastuti T, Utami TW. 2017. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) pada *Streptococcus mutans* ATCC 35668. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia* 3:1-7.
- Rathore SK, Bhatt S, Dhyani S, Jain A. 2012. Preliminary phytochemical screening of medicinal plant *Ziziphus mauritiana* Lam. fruits. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 4:160-162.
- Rijke E. 2005. *Trace-level Determination of Flavonoid and Their Conjugates Application to Plant of The Leguminosae Family*. [disetasi]. Amsterdam: Universitas Amsterdam.
- Saepudin, Sulistiawan RY, Hanifah, S. 2007. Perbandingan penggunaan antibiotika pada pengobatan pasien infeksi saluran kemih yang menjalani rawat inap di salah satu RSUD di Yogyakarta tahun 2004 dan 2006. [Skripsi]. Yogyakarta. Fakultas Mipa Jurusan Farmasi. Universitas Islam Indonesia.
- Steenis Van CGGJ. 2005. *Flora*. Jakarta:Pradnya Paramita.
- Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta:Papas Sinar Sinanti.
- Suriawiria U. 2008. *Mikrobiologi Air*. Jakarta:PT Alumni.
- Todar K. 2005. Online Textbook of Bacteriology. Science Magazine.
- Tortora JG, Funke RB, Case LC. 2007. *Microbiology an Introduction*. 9<sup>th</sup> ed. San Fransisco: Pearson Benjamin Cummings.

- Upadhyay S, Upadhyay P, Ghosh AK, Singh V. 2012. *Ziziphus mauritiana*: A Review on Pharmacological Potential of This Underutilized Plant. *International Journal of Current Research and Review* 4:3.
- Wagner H, Bladt S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, Second Edition*. New York:Springer.
- Wijayakusuma Hembing, HM. 1992. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*. Jakarta: Pustaka Kartini.
- Wirjowidagdo, Sudjaswadi, M Sitanggang. 2008. *Tanaman Obat untuk Penyakit Jantung, Darah Tinggi dan Kolesterol*. Jakarta Selatan: Agromedia.

L

A

M

P

9

R

A

N

## Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman



No : 213/DET/UPT-LAB/31/III/2018  
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :  
Nama : Rossy Kurniawati  
NIM : 20144301 A  
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Bidara / *Zizyphus mauritina* Lamk.**

Hasil determinasi berdasarkan : Steenis : FLORA

1b - 2b - 3b - 4b - 6b - 7b - 9b - 10b - 11b - 12b - 13b - 14a - 15a. golongan 8. 109b - 119b - 120b - 128b - 129b - 135b - 136b - 139b - 140b - 142b - 143b - 146a - 147b - 150b - 151a. familia 71. Rhamnaceae. 1. *Zizyphus*. 2. *Zizyphus mauritina* Lamk.

### Deskripsi :

Habitus : Pohon, tinggi 5 - 15 m.  
Akar : Sistem akar tunggang.  
Batang : Percabangan monopodial, batang bengkak dan bertonjolan, ranting kerap kali menggantung  
Daun : Tunggal, bertangkai, bulat telur oval, panjang 4 - 7 cm, lebar 2 - 5 cm, bertulang daun 3, bergerigi lemah, dari bawah putih atau coklat karat seperti vilt. Daun penumpu bentuk duri, hampir selalu salah satu dari keduanya gagal tumbuhnya.  
Bunga : Majemuk payung tambahan, bertangkai pendek atau duduk, berambut seperti vilt, di ketiak. Daun pelindung bulat telur, berambut coklat karat. Bunga garis tengah lk 0,5 cm. Kelopak kuning hijau, separo jalan berlekuk 5, taju segi 3 bulat telur, dari dalam berhunas, dari luar bentuk vilt. Daun mahkota 5, bulat telur terbalik, bentuk tudung, putih. Tonjolan dasar bunga datar, berlekuk 10, mengelilingi bakal buah yang beruang 2. Cabang tangkai putik 2.  
Buah : Buah batu berdaging, bentuk bola oval, panjang 1,5 - 2 cm, mula-mula kuning, kemudian merah tua, gundul.  
Pustaka : Steenis C.G.G.J., Bloembergen S. Eyma P.J. (1978): *FLORA*, PT Pradnya Paramita. Jl. KebonSirih 46 Jakarta Pusat, 1978.

Jakarta, 31 Maret 2018  
Tanda Tangan  
Martinah Wijosoendjojo, SU

**Lampiran 2. Hasil pembuatan serbuk bidara****Gambar buah bidara****Gambar simplisia buah bidara****Gambar serbuk buah bidara**

**Lampiran 3. Gambar alat yang digunakan**



**Vortex**



**Inkubator**



**Pengilingan**



*Moisture balance*



**Botol maserasi**



**Evaporator**

**Lampiran 4. Perhitungan rendemen bobot kering terhadap bobot basah buah bidara**

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%) bb
10000	2100	21,00

Perhitungan :

$$\begin{aligned}\text{Rendemen (\%)} &= \frac{\text{Bobot kering}}{\text{Bobot basah}} \times 100 \% \\ &= \frac{2100}{10000} \times 100 \% \\ &= 21,00 \%\end{aligned}$$

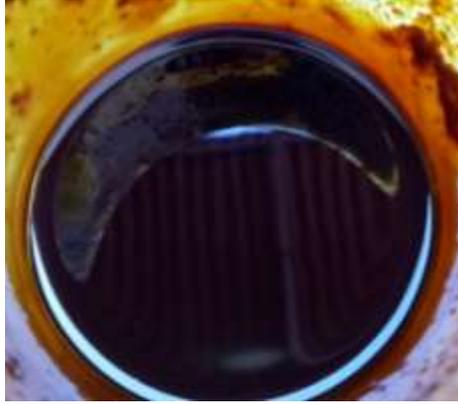
**Lampiran 5. Perhitungan rendemen ekstrak etanol buah bidara**

Serbuk buah bidara (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%) b/b
800	270	33,75

Perhitungan :

$$\begin{aligned}\text{Rendemen (\%)} &= \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat serbuk}} \\ &= \frac{270}{800} \times 100 \% \\ &= 33,75 \%\end{aligned}$$

**Lampiran 6. Hasil tes bebas etanol**



**Gambar ekstrak etanol buah bidara**



**Gambar uji bebas etanol**

**Lampiran 7. Hasil fraksinasi**Fraksinasi *n*-heksana

Residu



Fraksinasi etil asetat

Fraksinasi air

Fraksi *n*-heksana

Fraksi etil asetat



Fraksi air

**Lampiran 8. Perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana buah bidara**

Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen % (b/b)
120	4,17	3,48

Perhitungan :

$$\begin{aligned}\text{Rendemen (\%)} &= \frac{\text{Bobot fraksi}}{\text{Bobot ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{4,17}{120} \times 100 \% \\ &= 3,48 \%\end{aligned}$$

**Lampiran 9. Perhitungan rendemen fraksi etil asetat**

Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen % (b/b)
120	7,81	6,50

Perhitungan :

$$\begin{aligned}\text{Rendemen (\%)} &= \frac{\text{Bobot fraksi}}{\text{Bobot ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{7,81}{120} \times 100 \% \\ &= 6,50 \%\end{aligned}$$

**Lampiran 10. Perhitungan rendemen fraksi air**

Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen % (b/b)
120	104,64	87,20

Perhitungan :

$$\begin{aligned}\text{Rendemen (\%)} &= \frac{\text{Bobot fraksi}}{\text{Bobot ekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{104,64}{120} \times 100 \% \\ &= 87,20 \%\end{aligned}$$

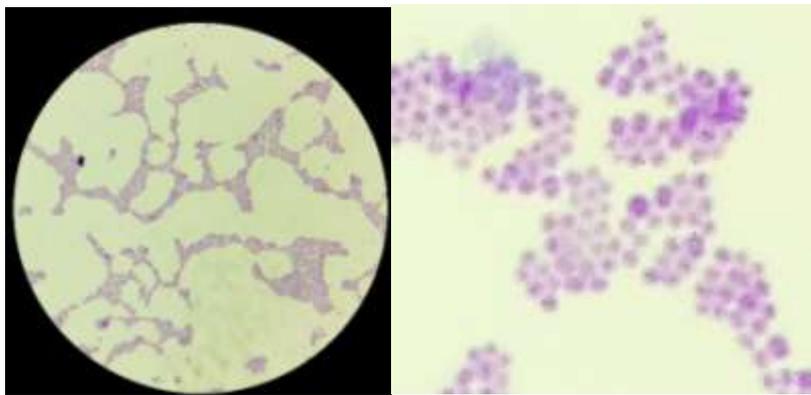
**Lampiran 11. Hasil identifikasi golongan senyawa**

Senyawa	Serbuk	Ekstrak	Fraksi		
			<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
Alkaloid					
Flavonoid					
Saponin					
Tanin					
Polifenol					

**Lampiran 12. Hasil identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



**Gambar hasil identifikasi secara makroskopis**



**Gambar hasil pewarnaan Gram**

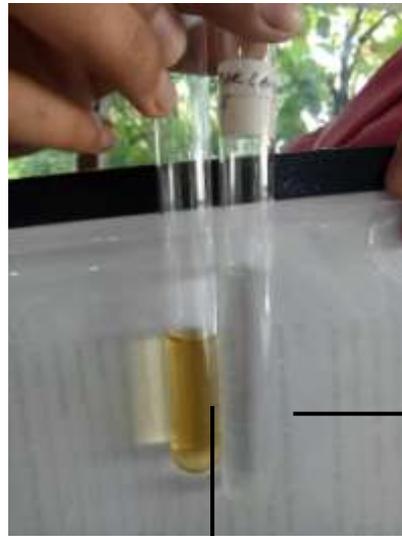


**Gambar hasil uji katalase**



**Gambar hasil uji koagulase**

**Lampiran 13. Hasil pembuatan suspensi bakteri uji**



Standar Mc Farland

Suspensi  
*Staphylococcus aureus*

## Lampiran 14. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat secara difusi

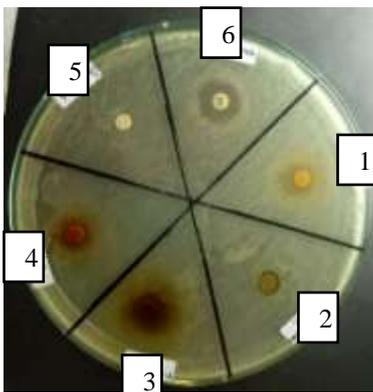
### 1. Konsentrasi 50%



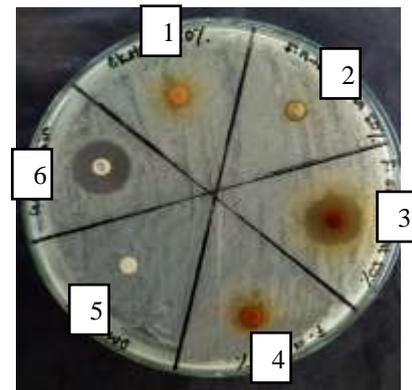
Keterangan :

1. Ekstrak
2. Fraksi *n*-heksana
3. Fraksi etilasetat
4. Fraksi air

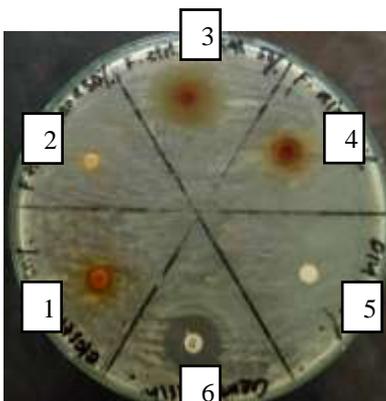
Larutan stok konsentrasi 50%



Replikasi 1



Replikasi 2

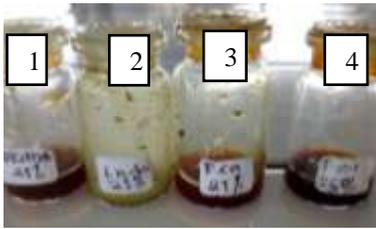


Replikasi 3

Keterangan :

1. Ekstrak etanol 50%
2. Fraksi *n*-heksana 50%
3. Fraksi etil asetat 50%
4. Fraksi air 50%
5. DMSO 5%
6. Gentamisin

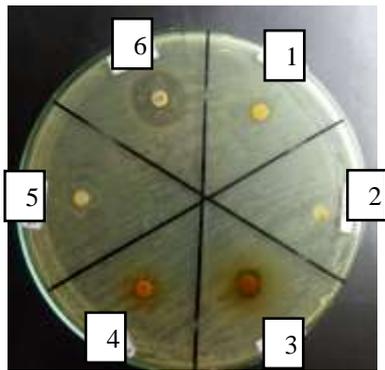
## 2. Konsentrasi 25%



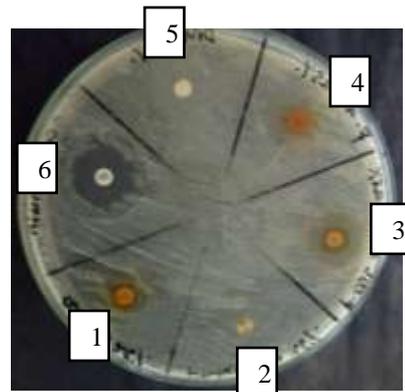
Keterangan :

1. Ekstrak
2. Fraksi *n*-heksana
3. Fraksi etilasetat
4. Fraksi air

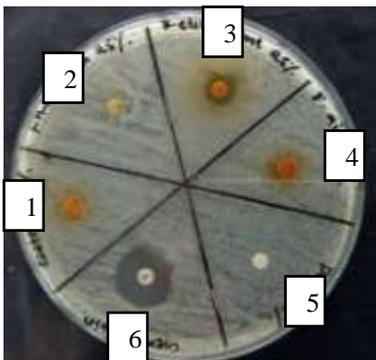
Larutan stok konsentrasi 25%



Replikasi 1



Replikasi 2

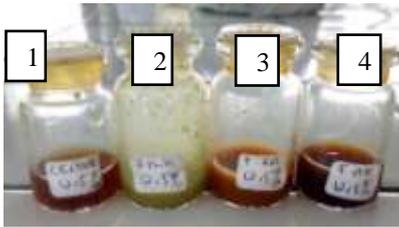


Replikasi 3

Keterangan :

1. Ekstrak etanol 25%
2. Fraksi *n*-heksana 25%
3. Fraksi etil asetat 25%
4. Fraksi air 25%
5. DMSO 5%
6. Gentamisin

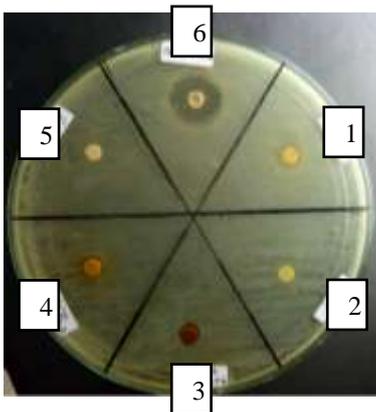
### 3. Konsentrasi 12,5%



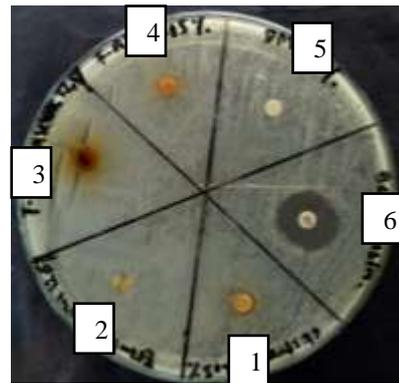
Keterangan :

1. Ekstrak
2. Fraksi *n*-heksana
3. Fraksi etilasetat
4. Fraksi air

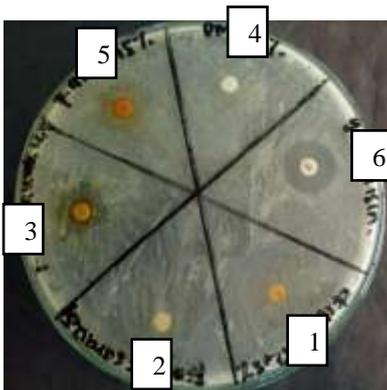
Larutan stok konsentrasi 12,5%



Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3

Keterangan :

1. Ekstrak etanol 12,5%
2. Fraksi *n*-heksana 12,5%
3. Fraksi etil asetat 12,5%
4. Fraksi air 12,5%
5. DMSO 5%
6. Gentamisin

**Lampiran 15. Perhitungan pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi  
*n*-heksana, etil asetat dan air metode difusi**

1. Konsentrasi 50%

Menimbang 0,5 gram dilarutkan dengan DMSO 5% sampai 1 mL.

2. Konsentrasi 25%

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

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

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

Dipipet 0,5 mL dari sediaan 50% kemudian ditambah DMSO 5% sampai 1 mL.

3. Konsentrasi 12,5%

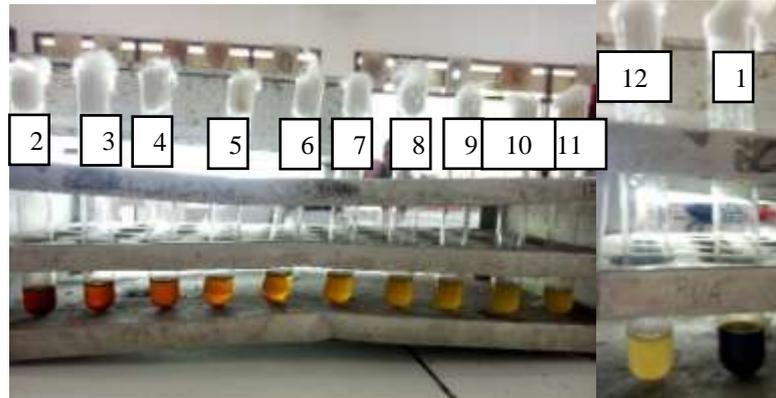
$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

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

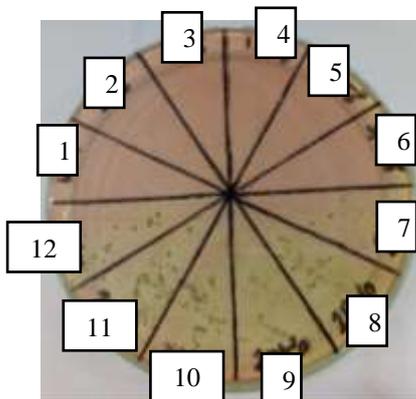
$$= 0,5 \text{ mL}$$

Dipipet 0,5 mL dari sediaan 25% kemudian ditambah DMSO 5% sampai 1 mL.

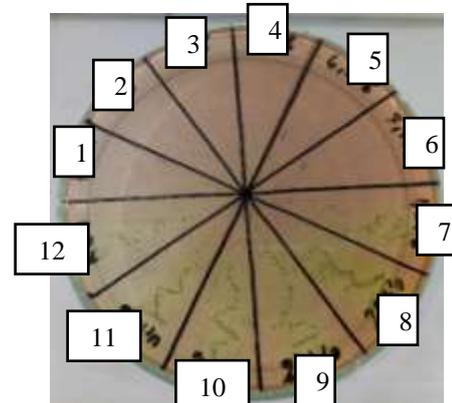
### Lampiran 16. Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi



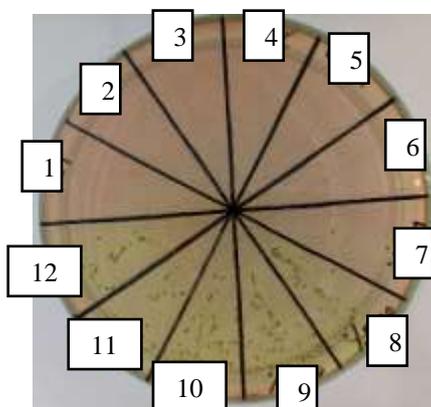
Larutan stok fraksi etil asetat metode dilusi



Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3

Keterangan :

1. Kontrol negatif (-)
2. Konsentrasi 50%
3. Konsentrasi 25%
4. Konsentrasi 12,5%
5. Konsentrasi 6,25%
6. Konsentrasi 3,13%
7. Konsentrasi 1,57%
8. Konsentrasi 0,79%
9. Konsentrasi 0,40%
10. Konsentrasi 0,20%
11. Konsentrasi 0,10%
12. Kontrol positif (+)

### Lampiran 17. Perhitungan larutan stok fraksi etil asetat metode dilusi

$$\text{Konsentrasi 50\%} = b/v = 50 \text{ gram}/100 \text{ mL} = 0,5 \text{ gram/mL}$$

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

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

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

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 3,13\%} &= V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \\ &= 0,5 \cdot 6,25\% = 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 3,13\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 1,57\%} &= V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \\ &= 0,5 \cdot 3,13\% = 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 1,57\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 0,79\%} &= V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \\ &= 0,5 \cdot 1,57\% = 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 0,79\% \end{aligned}$$

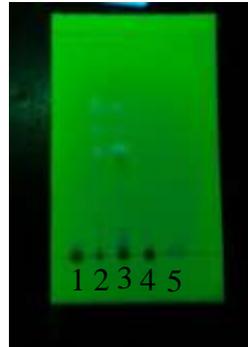
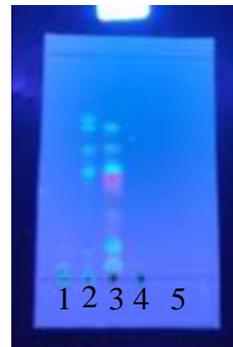
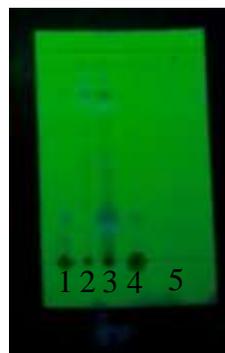
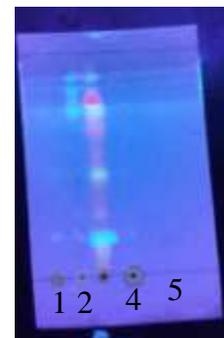
$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 0,40\%} &= V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \\ &= 0,5 \cdot 0,79\% = 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 0,40\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 0,20\%} &= V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \\ &= 0,5 \cdot 0,40\% = 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 0,20\% \end{aligned}$$

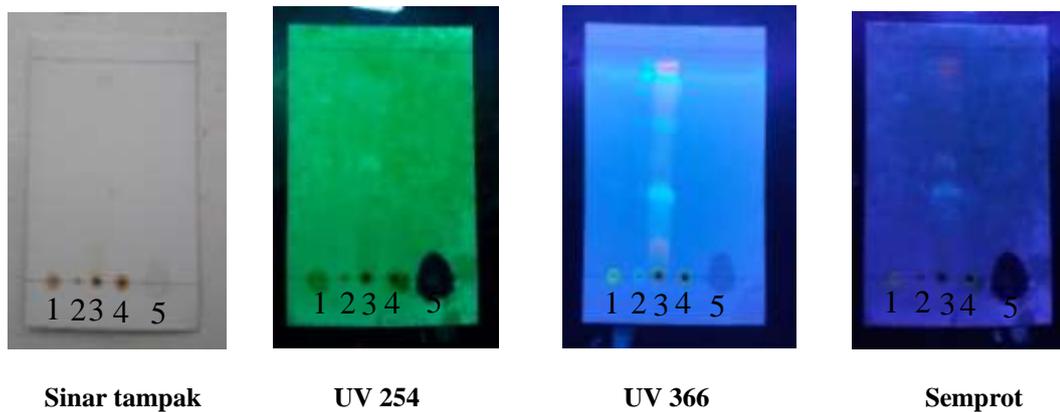
$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 0,10\%} &= V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \\ &= 0,5 \cdot 0,20\% = 1 \cdot C_2 \\ C_2 &= 0,10\% \end{aligned}$$

Kontrol negatif (-) : 1 mL fraksi etil asetat

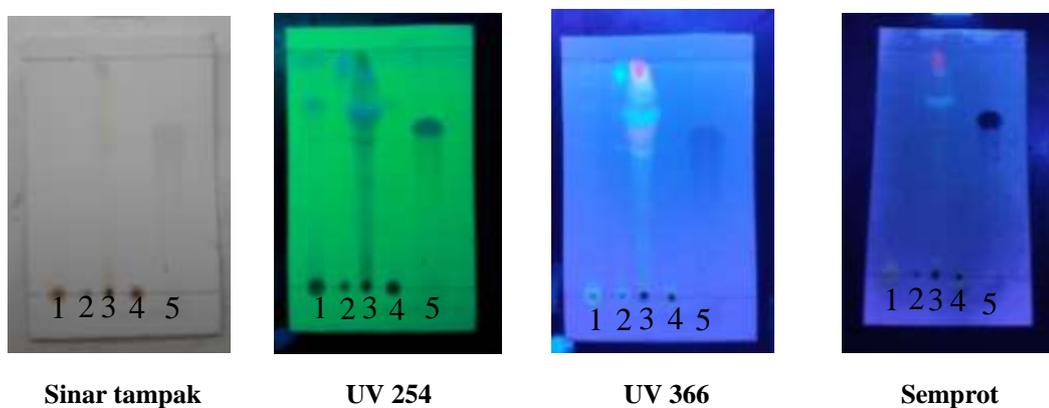
Kontrol positif (+) : 1 mL suspensi bakteri

**Lampiran 18. Hasil identifikasi kandungan kimia secara KLT****Hasil identifikasi alkaloid****Sinar tampak****UV 254****UV 366****Semprot****Hasil identifikasi flavonoid****Sinar tampak****UV 254****UV 366****Semprot****Hasil identifikasi saponin****Sinar tampak****UV 254****UV 366****Semprot**

### Hasil identifikasi tanin



### Hasil identifikasi polifenol



Keterangan :

- 1 : ekstrak etanol
- 2 : fraksi *n*-heksana
- 3 : fraksi etil asetat
- 4 : fraksi air
- 5 : baku pembanding

Baku Pembanding alkaloid : kafein

Baku pembanding flavonoid : quersetin

Baku pembanding saponin : saponin

Baku pembanding tanin : asam galat

Baku pembanding polifenol : asam galat

### Lampiran 19. Hasil perhitungan Rf

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut pengembang}}$$

#### 1. Alkaloid

➤ Rf ekstrak

$$R_f = \frac{0,7}{5} = 0,14$$

$$R_f = \frac{2,6}{5} = 0,52$$

➤ Rf fraksi *n*-heksana

$$R_f = \frac{0,8}{5} = 0,16$$

$$R_f = \frac{3,9}{5} = 0,78$$

$$R_f = \frac{3,6}{5} = 0,72$$

$$R_f = \frac{4,1}{5} = 0,51$$

➤ Rf fraksi etil asetat

$$R_f = \frac{0,8}{5} = 0,16$$

$$R_f = \frac{3,6}{5} = 0,72$$

$$R_f = \frac{2,5}{5} = 0,50$$

$$R_f = \frac{3,9}{5} = 0,78$$

$$R_f = \frac{3,1}{5} = 0,62$$

➤ Rf fraksi air

$$R_f = \frac{1,3}{5} = 0,26$$

$$R_f = \frac{2,7}{5} = 0,54$$

#### 2. Flavonoid

➤ Rf ekstrak

$$R_f = \frac{0,8}{5} = 0,16$$

$$R_f = \frac{3,9}{5} = 0,78$$

➤ Rf fraksi *n*-heksana

$$R_f = \frac{0,8}{5} = 0,16$$

$$R_f = \frac{4,1}{5} = 0,82$$

$$R_f = \frac{1,1}{5} = 0,22$$

$$R_f = \frac{4,4}{5} = 0,88$$

$$R_f = \frac{3,9}{5} = 0,78$$

➤ Rf fraksi etil asetat

$$R_f = \frac{0,9}{5} = 0,18$$

$$R_f = \frac{3,9}{5} = 0,78$$

$$R_f = \frac{2,4}{5} = 0,48$$

$$R_f = \frac{4,2}{5} = 0,84$$

$$R_f = \frac{3,4}{5} = 0,68$$

$$R_f = \frac{4,5}{5} = 0,90$$

➤ Rf fraksi air

$$R_f = \frac{1,1}{5} = 0,22$$

➤ Rf baku

$$R_f = \frac{1,0}{5} = 0,20$$

## 3. Saponin

- Rf ekstrak  
 $Rf = \frac{4,6}{5} = 0,92$
- Rf fraksi etil asetat  
 $Rf = \frac{4,6}{5} = 0,92$
- Rf fraksi air  
 $Rf = \frac{4,3}{5} = 0,86$
- Rf baku  
 $Rf = \frac{4,7}{5} = 0,94$

## 4. Polifenol

- Rf ekstrak  
 $Rf = \frac{4,0}{5} = 0,8$
- Rf fraksi *n*-heksana  
 $Rf = \frac{4,9}{5} = 0,98$
- Rf fraksi etil asetat  
 $Rf = \frac{3,3}{5} = 0,66$
- $Rf = \frac{3,6}{5} = 0,72$
- Rf air  
 $Rf = \frac{3,5}{5} = 0,7$
- Rf baku  
 $Rf = \frac{3,6}{5} = 0,72$

$$Rf = \frac{4,8}{5} = 0,96$$

## 5. Tanin

- Rf ekstrak  
 $Rf = \frac{4,0}{5} = 0,80$
- $Rf = \frac{4,5}{5} = 0,90$
- Rf fraksi *n*-heksana  
 $Rf = \frac{4,4}{5} = 0,88$
- $Rf = \frac{4,5}{5} = 0,90$
- Rf fraksi etil asetat  
 $Rf = \frac{0,8}{5} = 0,16$
- $Rf = \frac{1,1}{5} = 0,22$
- $Rf = \frac{2,0}{5} = 0,40$
- Rf fraksi air  
 $Rf = \frac{4,3}{5} = 0,86$

$$Rf = \frac{3,7}{5} = 0,74$$

$$Rf = \frac{4,5}{5} = 0,90$$

$$Rf = \frac{4,6}{5} = 0,92$$

## Lampiran 20. Hasil analisis data metode difusi secara ANOVA

### Uji Kolmogorov-Smirnov

Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANOVA

Kriteria uji :

- Sig < 0,05 berarti  $H_0$  ditolak
- Sig > 0,05 berarti  $H_0$  diterima

Hasil :

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Diameter hambat
N		42
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	10.0476
	Std. Deviation	5.45470
Most Extreme Differences	Absolute	.194
	Positive	.194
	Negative	-.158
Kolmogorov-Smirnov Z		1.257
Asymp. Sig. (2-tailed)		.085

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Kesimpulan : sig > 0,05 maka data diameter hambat terdistribusi normal,

### Uji Homogenitas

Tujuan : untuk mengetahui homogenitas

Kriteria uji :

- Sig < 0,05 berarti  $H_0$  ditolak
- Sig > 0,05 berarti  $H_0$  diterima

Hasil :

### Test of Homogeneity of Variances

Diameter hambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.751	13	28	.104

Kesimpulan : sig > 0,05 ( $H_0$  diterima) maka data diameter hambat homogen.

### Uji Two Way ANOVA

Uji Post Hoc

Tujuan : untuk mengetahui pada kelompok mana terdapat perbedaan persen diameter hambat yang bermakna.

Kriteria uji :

- Sig < 0,05 berarti  $H_0$  ditolak
- Sig > 0,05 berarti  $H_0$  diterima

### Multiple Comparisons

dayahambat

Tukey HSD

(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak	fraksi n-heksana	.8889	.79866	.873	-1.5139	3.2917
	fraksi etil asetat	-6.0000*	.79866	.000	-8.4028	-3.5972
	fraksi air	-1.6667	.79866	.317	-4.0695	.7362
	gentamisin	-13.8856*	.79866	.000	-16.2884	-11.4827
	dmso	8.4444*	.79866	.000	6.0416	10.8473
fraksi n-heksana	ekstrak	-.8889	.79866	.873	-3.2917	1.5139
	fraksi etil asetat	-6.8889*	.79866	.000	-9.2917	-4.4861
	fraksi air	-2.5556*	.79866	.032	-4.9584	-.1527
	gentamisin	-14.7744*	.79866	.000	-17.1773	-12.3716

	dmso	7.5556*	.79866	.000	5.1527	9.9584
fraksi etil asetat	ekstrak	6.0000*	.79866	.000	3.5972	8.4028
	fraksi n-heksana	6.8889*	.79866	.000	4.4861	9.2917
	fraksi air	4.3333*	.79866	.000	1.9305	6.7362
	gentamisin	-7.8856*	.79866	.000	-10.2884	-5.4827
	dmso	14.4444*	.79866	.000	12.0416	16.8473
fraksi air	ekstrak	1.6667	.79866	.317	-.7362	4.0695
	fraksi n-heksana	2.5556*	.79866	.032	.1527	4.9584
	fraksi etil asetat	-4.3333*	.79866	.000	-6.7362	-1.9305
	gentamisin	-12.2189*	.79866	.000	-14.6217	-9.8161
	dmso	10.1111*	.79866	.000	7.7083	12.5139
gentamisin	ekstrak	13.8856*	.79866	.000	11.4827	16.2884
	fraksi n-heksana	14.7744*	.79866	.000	12.3716	17.1773
	fraksi etil asetat	7.8856*	.79866	.000	5.4827	10.2884
	fraksi air	12.2189*	.79866	.000	9.8161	14.6217
	dmso	22.3300*	.79866	.000	19.9272	24.7328
dmso	ekstrak	-8.4444*	.79866	.000	-10.8473	-6.0416
	fraksi n-heksana	-7.5556*	.79866	.000	-9.9584	-5.1527
	fraksi etil asetat	-14.4444*	.79866	.000	-16.8473	-12.0416
	fraksi air	-10.1111*	.79866	.000	-12.5139	-7.7083
	gentamisin	-22.3300*	.79866	.000	-24.7328	-19.9272

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2.870.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

dayahambat

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

Sampel	N	Subset				
		1	2	3	4	5
dmso	9	.0000				
fraksi n-heksana	9		7.5556			
ekstrak	9		8.4444	8.4444		
fraksi air	9			10.1111		
fraksi etil asetat	9				14.4444	
gentamisin	9					22.3300
Sig.		1.000	.873	.317	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2.870.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.

## Lampiran 21. Formulasi dan pembuatan media

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

Brain infusion solids .....	12,5 gram
Beef heart infusion solids.....	5,0 gram
Proteose peptone .....	10,0 gram
Glucose.....	2,0 gram
Sodium chloride .....	5,0 gram
Disodium phosphate.....	2,5 gram

Cara pembuatan:

Timbang 37 gram media, ditambahkan aquadest sampai 1000 mL. Dipanaskan sampai larut. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

pH media *Brain Heart Infusion* (BHI) adalah  $7,4 \pm 0,2$  pada suhu 25°C

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

Beef extract .....	2,0 gram
Acid hydrolysate of casein .....	17,5 gram
Starch.....	1,5 gram
Agar.....	17,0 gram

Cara pembuatan:

Timbang 38 gram media, ditambahkan aquadest sampai 1000 mL. Dipanaskan sampai mendidih. Disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

pH media *Mueller Hinton Agar* (MHA) adalah  $7,3 \pm 0,1$  pada suhu 25°C.

### 3. Formulasi dan pembuatan *Vogel Johnson Agar* (VJA)

Tryptone .....	10,000 gram
Yeast extract.....	5,000 gram
Mannitol .....	10,000 gram
Dipotassium phosphate .....	5,000 gram
Lithium chloride.....	5,000 gram
Glycine .....	10,000 gram

Phenol red..... 0,025 gram

Agar..... 16,000 gram

Cara pembuatan:

Timbang 61 gram media, ditambahkan aquadest sampai 1000 mL.

Dipanaskan sampai mendidih. Disterilkan dengan autoclave pada suhu

121°C selama 15 menit. Ketika digunakan tambahkan Kalium tellurit 2-3

tetes.

pH media *Vogel Johnson Agar* (VJA) adalah  $7,2 \pm 0,2$  pada suhu 25°C.