

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, KLOOROFORM,  
DAN AIR DARI EKSTRAK METANOL BUAH BELIMBING WULUH  
(*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP *Shigella dysenteriae* ATCC 9361**



Oleh :

**Shintha Ramadhani**

**17113264 A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, KLOOROFORM,  
DAN AIR DARI EKSTRAK METANOL BUAH BELIMBING WULUH  
(*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP *Shigella dysenteriae* ATCC 9361**

*SKRIPSI*

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

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

**Oleh :**

**Shintha Ramadhani**

**17113264 A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**PENGESAHAN SKRIPSI**

Berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, KLOOROFORM,  
DAN AIR DARI EKSTRAK METANOL BUAH BELIMBING WULUH  
(*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP *Shigella dysenteriae* ATCC 9361**

Oleh :  
**Shintha Ramadhani**  
17113264 A

Dipertahankan di hadapan panitia penguji skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada tanggal : 14 Agustus 2018



Dekan,

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

Mengetahui,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi

Pembimbing Utama

Dr. Ana Indrayati. M.Si.

Pembimbing Pendamping

Reslely Harjanti. S.Farm., M.Sc., Apt.

Penguji:

1. Mamik Ponco Rahayu, S.Si., M.Si., Apt.
2. Destik Wulandari, S.Pd., M.Si.
3. Vivin Nopiyanti, S.Farm., M.Sc., Apt.
4. Dr. Ana Indrayati. M.Si.

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

## **HALAMAN PERSEMBAHAN**

*“Bertakwalah pada Allah maka Allah akan mengajarimu. Sesungguhnya Allah Maha mengetahui segala sesuatu.”*  
(QS Al-Baqarah : 282)

*“Barangsiapa bersungguh – sungguh, sesungguhnya kesungguhannya itu adalah untuk dirinya sendiri.”*  
(QS Al-Ankabut [29]:6)

*“Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu. Dan boleh jadi kamu mencintai sesuatu, padahal ia amat buruk bagimu. Allah maha mengetahui sedangkan kamu tidak mengetahui.”*  
(QS Al-Baqarah : 216)

**Skripsi ini penulis persembahkan untuk :**

- **Allah SWT**
- **Ayah,ibu kedua kakakku dan adikku tercinta**
- **Agama, Almamater, Bangsa dan Negara**

## **PERNYATAAN**

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

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

Surakarta, Agustus 2018



Shintha Ramadhani

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan karuniaNya, sehingga pada akhirnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, KLOOROFORM, DAN AIR DARI EKSTRAK METANOL BUAH BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP *Shigella dysenteriae* ATCC 9361**. Skripsi ini disusun untuk memenuhi persyaratan guna mencapai gelar Sarjana Farmasi di Universitas Setia Budi.

Di dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak, maka pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada yang terhormat :

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA. Selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. RA. Oetari, SU.,M.M.,M.Sc.,Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Dr. Ana Indrayati, S.Si.,M.Si. selaku pembimbing utama yang telah memberikan nasehat dan petunjuk dalam penyusunan skripsi ini.
4. Reslely Harjanti, M.Sc.,Apt, selaku pembimbing pendamping yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini.
5. Tim penguji yang telah menyediakan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk menyusun skripsi ini.

6. Segenap Dosen, Karyawan, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah banyak membantu bagi kelancaran pelaksanaan skripsi ini.
7. Ibu dan Ayah yang selalu ku cintai terimakasih atas doa dan dukungan yang telah di berikan baik dalam hal moril maupun materil.
8. Kak Dini, Mas Anang, Bang Yogi, Mba Lia, dan adik ku Niken juga keponakan – keponakan ku Hani, Alesha, Tata, Yuka terimakasih atas dukungan dan semangat yang selalu diberikan.
9. Teman – teman ku Evan, Sasa, Rantika, Maydi, Vini, Mely, Selvy terimakasih atas segala dukungan dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, meskipun penulis sudah berusaha semaksimal mungkin di dalam menyajikannya. Kritik dan saran yang bersifat membangun dari para pembaca akan penulis terima dengan terbuka dan senang hati. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi Fakultas Farmasi dan bagi pembaca pada umumnya.

Surakarta, Agustus 2018



Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iii
HALAM PERSEMBAHAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	x
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang Masalah .....	1
B. Rumusan Masalah .....	4
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Manfaat Penelitian .....	4
BAB II TINJAUAN PUSATAKA .....	5
A. Tanaman Belimbing Wuluh ( <i>Averrhoa bilimbi</i> L.).....	5
1. Sistematika tanaman .....	5
2. Nama lain .....	6
3. Morfologi tanaman.....	6
4. Kandungan kimia .....	6
4.1.Flavonoid .....	6
4.2.Triterpenoid .....	7
4.3.Saponin .....	7
4.4.Tanin .....	7
5. Manfaat tanaman .....	8
6. Perkembangan penelitian buah belimbing wuluh .....	8
B. Metode Penyarian.....	9
1. Simplisia.....	9
2. Pengeringan .....	9
3. Ekstraksi.....	9
4. Perkolasi.....	10
5. Fraksinasi .....	10
6. Larutan penyari .....	11



6.1. Metanol .....	11
6.2. n-heksan .....	11
6.3. Kloroform .....	11
6.4. Air .....	12
C. <i>Shigella dysenteriae</i> .....	12
1. Klasifikasi <i>Shigella dysenteriae</i> .....	12
2. Morfologi bakteri .....	12
3. Patogenesis .....	13
4. Pengobatan .....	13
D. Media .....	14
1. Pengertian media .....	14
2. Klasifikasi media .....	14
2.1. Media padat .....	14
2.2. Media cair .....	14
2.3. Media semi cair atau semi padat .....	14
E. Sterilisasi .....	15
F. Antibakteri .....	15
1. Definisi antibakteri .....	15
2. Mekanisme antibakteri .....	15
2.1. Menghambat sintesis dinding sel bakteri .....	16
2.2. Mengganggu permeabilitas membran sel bakteri .....	16
2.3. Menghambat metabolisme sel bakteri .....	16
2.4. Menghambat sintesis protein sel bakteri .....	17
2.5. Menghambat asam nukleat sel bakteri .....	17
G. Metode pengujian aktivitas antibakteri .....	17
1. Metode difusi .....	17
2. Metode dilusi .....	18
H. Landasan Teori .....	18
I. Hipotesis .....	20
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>21</b>
A. Populasi dan sampel .....	21
B. Variabel penelitian .....	21
1. Identifikasi variabel utama .....	21
2. Klasifikasi variabel utama .....	21
3. Definisi Operasional Variabel .....	22
C. Bahan dan Alat .....	23
1. Bahan .....	23
1.1. Bahan sampel .....	23
1.2. Bahan kimia .....	23
1.3. Bakteri uji .....	23
2. Alat .....	23
D. Jalannya Penelitian .....	23
1. Determinasi Tanaman .....	23
2. Pengambilan Sampel .....	24
3. Pengeringan Bahan .....	24

4. Pembuatan Serbuk.....	24
5. Penetapan Kadar Air .....	24
6. Pembuatan Ekstrak Metanolik Buah Belimbing Wuluh .....	24
7. Uji Bebas Metanol .....	25
8. Fraksinasi .....	25
9. Identifikasi Kandungan Kimia .....	25
10. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji.....	26
11. Identifikasi Bakteri Uji.....	27
11.1. Identifikasi dengan cawan gores .....	27
11.2. Pewarnaan .....	27
11.3. Identifikasi dengan uji biokimia.....	27
11.3.1. Uji pada media SIM .....	27
11.3.2. Uji pada media KIA .....	27
11.3.3. Uji pada media LIA.....	28
11.3.4. Uji pada media Sitrat.....	28
12. Pengujian Aktivitas Antibakteri .....	29
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>33</b>
A. Hasil penelitian .....	33
1. Determinasi tanaman belimbing wuluh .....	33
2. Pembuatan serbuk buah belimbing wuluh .....	33
3. Penetapan susust pengeringan serbuk buah belimbing wuluh ...	34
4. Pembuatan ekstrak metanol buah belimbing wuluh.....	34
5. Uji bebas metanol ekstrak buah belimbing wuluh .....	35
6. Fraksinasi ekstrak buah belimbing wuluh.....	35
7. Identifikasi senyawa kimia serbuk, ekstrak, dan fraksi buah belimbing wuluh .....	36
8. Identifikasi bakteri <i>S. dysenteriae</i> ATCC 9361 .....	37
8.1. Metode goresan .....	37
8.2. Metode mikroskopis dengan pewarnaan gram.....	37
8.3. Uji biokimia .....	38
9. Pengujian aktivitas antibakteri buah belimbing wuluh .....	39
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
A. Kesimpulan .....	44
B. Saran.....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>45</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>49</b>

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. <i>Averrhoa bilimbi</i> L. ....	5
Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak metanol dan fraksi buah belimbing wuluh ( <i>Averrhoa bilimbi</i> L.) .....	29
Gambar 3. Skema pembuatan suspensi bakteri .....	30
Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak metanol, fraksi <i>n</i> -heksana, kloroform, dan air dari buah belimbing wuluh ( <i>Averrhoa bilimbi</i> L.) terhadap bakteri <i>S. dysenteriae</i> ATCC 9361 dengan metode difusi .....	31

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah buah belimbing wuluh .....	33
Tabel 2. Prosentase bobot serbuk halus terhadap bobot serbuk kasar buah belimbing wuluh .....	34
Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan buah belimbing wuluh menggunakan alat <i>Sterling Bidwel</i> .....	34
Tabel 4. Rendemen ekstrak metanol buah belimbing wuluh .....	35
Tabel 5. Tes bebas metanol ekstrak buah belimbing wuluh .....	35
Tabel 6. Hasil fraksinasi ekstrak buah belimbing wuluh.....	36
Tabel 7. Hasil identifikasi senyawa kimia, serbuk, ekstrak dan fraksi buah belimbing wuluh .....	37
Tabel 8. Hasil identifikasi uji biokimia pada <i>S. dysenteriae</i> ATCC 9361.....	38
Tabel 9. Hasil diameter hambat uji aktivitas antibakteri secara difusi .....	40

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat keterangan determinasi .....	47
Lampiran 2. Gambar buah belimbing wuluh dan serbuk belimbing wuluh .....	48
Lampiran 3. Gambar alat fraksinasi.....	49
Lampiran 4. Gambar evaporator dan oven .....	50
Lampiran 5. Gambar hasil ekstrak metanol, fraksi <i>n</i> -heksana, kloroform, dan air dari buah belimbing wuluh .....	51
Lampiran 6. Gambar hasil identifikasi senyawa kimia .....	52
Lampiran 7. Gambar hasil identifikasi <i>S. dysenteriae</i> ATCC 9361 .....	53
Lampiran 8. Gambar hasil difusi ekstrak metanol, fraksi <i>n</i> -heksana, kloroform, dan air terhadap <i>S. dysenteriae</i> ATCC 9361.....	55
Lampiran 9. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah buah belimbing wuluh.....	58
Lampiran 10. Perhitungan susut pengeringan serbuk buah belimbing wuluh	59
Lampiran 11. Perhitungan persentase rendemen hasil ekstrak metanol buah belimbing wuluh .....	60
Lampiran 12. Perhitungan rendemen fraksi <i>n</i> -heksana, kloroform, dan air dari ekstrak buah belimbing wuluh .....	61
Lampiran 13. Pembuatan larutan dengan berbagai konsentrasi .....	62
Lampiran 14. Formulasi dan pembuatan media .....	64
Lampiran 15. Hasil analisis statistik.....	71

## INTISARI

**RAMADHANI, S., 2018. UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, KLOOROFORM, DAN AIR DARI EKSTRAK METANOL BUAH BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP *Shigella dysenteriae* ATCC 9361. SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.**

Buah belimbing wuluh mengandung senyawa flavonoid, saponin, triterpenoid, dan tanin yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air dari buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361.

Ekstraksi buah belimbing wuluh menggunakan metode perkolasi dengan pelarut metanol, kemudian difraksinasi menggunakan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya. Hasil ekstraksi dan fraksinasi dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 menggunakan metode difusi. Konsentrasi ekstrak metanol dan fraksi yang digunakan adalah 400 mg/ml; 200 mg/ml; 100 mg/ml; 50 mg/ml; 25 mg/ml;

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361. Hasil dari uji difusi menunjukkan bahwa fraksi yang memiliki aktivitas paling efektif terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 adalah fraksi kloroform, dengan rata-rata diameter hambat sebesar 20,3 mm.

Kata kunci : buah belimbing wuluh, fraksinasi, *Shigella dysenteriae*, antibakteri.

## ABSTRACT

**RAMADHANI, S., 2018. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *n*-HEXANE, CHLOROFORM, AND WATER FRACTIONS FROM THE METHANOL EXTRACT OF BILIMBI FRUIT (*Averrhoa bilimbi* L.) AGAINST *Shigella dysenteriae* ATCC 9361, Thesis, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.**

The fruit of bilimbi has contains flavonoid, saponin, triterpenoid, and tannin compounds which have antibacterial activity against Gram positive and Gram negative bacteria. The purpose of this study was to test the antibacterial activity of *n*-hexane, chloroform, and water fractions from methanol extract of bilimbi fruit (*Averrhoa bilimbi* L.) against *Shigella dysenteriae* ATCC 9361.

The extraction of bilimbi fruit using percolation method with methanol as solvent, and then the fractionation was use the different level polarity diluents. The results of extraction and fractionations was tested of antibacterial activity agains *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 using diffusion method. The concentration of methanol extract and fractions was 400 mg/ml; 200 mg/ml; 100 mg/ml; 50 mg/ml; 25 mg/ml.

The result of this study showed that methanol extract, *n*-hexane, chloroform, and water fractions was have antibacterial activity against *Shigella dysenteriae* ATCC 9361. The result of the diffusion test shows that the fraction that have the most affective activity against *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 was fraction of choloroform, with average inhibitory diameter 20,3 mm.

Key words : bilimbi fruit, fractionation, *Shigella dysenteriae* ATCC 9361, antibacterial.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang Masalah

Manusia sebagai makhluk hidup yang memiliki aktivitas tinggi selalu kontak dengan berbagai macam mikroorganisme penyebab infeksi yaitu bakteri, jamur, virus, dan berbagai bentuk kehidupan parasit. Infeksi merupakan suatu keadaan masuknya mikroorganisme kedalam tubuh, berkembang biak dan menimbulkan penyakit. Bakteri adalah sel prokariotik yang khas, uniseluler, pleomorfik dan tidak mengandung struktur yang terbatas membran di dalam sitoplasmanya. Berdasarkan pewarnaan gram, bakteri dibagi menjadi dua yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif.

*Shigella dysenteriae* merupakan bakteri Gram negatif yang bersifat patogen karena menghasilkan endotoksin dan eksotoksin, dimana keduanya bekerja secara berurutan. Eksotoksin menyebabkan diare akut dan tidak disertai darah pada tinja, kemudian invasi pada usus besar yang disebabkan endotoksin sehingga terjadi disentri. *S. dysenteriae* memiliki morfologi batang ramping, tidak berflagel, tidak berkapsul, dan tidak membentuk spora. *S. dysenteriae* merupakan bakteri anaerob fakultatif, tetapi tumbuh paling baik pada kondisi aerob. Habitat alami bakteri *S. dysenteriae* adalah di usus besar manusia, sehingga infeksi *Shigella* praktis terbatas pada saluran cerna (Tiram 2016; Jawetz *et al* 2010).

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *S. dysenteriae* adalah disentri. Disentri merupakan penyakit infeksi saluran pencernaan yang ditandai dengan diare cair akut, tinja pada penderita penyakit diketahui mengandung darah dengan atau tanpa lendir, umumnya disertai demam, nyeri perut, anoreksia, dan tenesmus. Disentri merupakan penyakit yang mudah menular, penyakit ini masuk ke dalam tubuh melalui air dan makanan yang telah tercemar bakteri disentri yang dikonsumsi (Yatim 2001). Laporan epidemiologi menunjukkan bahwa 600.000 dari 140 juta infeksi *Shigella* meninggal setiap tahun di seluruh dunia. Di Indonesia, dilaporkan 60 juta pasien pertahun 70-80% mengenai anak berusia



dibawah 5 tahun. Data di Indonesia memperlihatkan 29% kematian yang disebabkan oleh disentri basiler terjadi pada umur 1 - 4 tahun (Nafianti & Sinuhaji 2005). Terapi antimikroba diberikan untuk mempersingkat berlangsungnya penyakit dan penyebaran bakteri, namun kasus resistensi dari *S. dysenteriae* terhadap antibiotik telah menyebar luas, sehingga membutuhkan alternatif pengobatan lain yang lebih aman, misalnya dengan tumbuhan obat yang memiliki potensi sebagai antibiotik. Tumbuhan obat tersebut salah satunya adalah buah belimbing wuluh.

Belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) merupakan salah satu spesies tanaman Indonesia, yang dapat tumbuh di daerah dengan ketinggian hingga 500 m di atas permukaan laut. Pada umumnya belimbing wuluh ditanam dalam pekarangan, untuk bumbu masakan dan peneduh halaman rumah (Sari & Suryani 2014). Tanaman belimbing wuluh dikenal sebagai tanaman obat. Daun digunakan sebagai obat encok, diabetes, sakit perut, rematik, penurun panas dan obat gondok. Sebagian masyarakat Indonesia juga memanfaatkan belimbing wuluh sebagai pengawet ikan. Daun, buah, dan batang tanaman belimbing wuluh mempunyai potensi sebagai antimikroba. Batangnya mengandung senyawa saponin yang diduga memiliki potensi sebagai antijamur. Daun berperan sebagai antimikroba karena mengandung senyawa tanin. Buah tanaman belimbing wuluh mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid yang diduga bersifat aktif sebagai antimikroba (Kandar 2010). Berdasarkan penelitian Rahmiati *et al* (2017), ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* dengan masing-masing konsentrasi 10 %b/v, 20 %b/v, 30 %b/v, 40 %b/v, mampu menghambat pertumbuhan keduanya dengan rata-rata diameter zona hambat 21,6 mm; 27,0 mm; 31,3 mm; dan 43,0 mm pada *S.aureus*, dan pada *S.epidermidis* memiliki rata-rata zona hambat sebesar 28,6 mm; 31,6 mm; 36,3; 39,0 mm.

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh (Das *et al* 2011) membuktikan bahwa ekstrak metanol daun dan buah belimbing wuluh memiliki aktivitas antibakteri, buah belimbing wuluh mempunyai potensi lebih besar dari pada daunnya. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak metanol daun belimbing

wuluh terhadap *Salmonella paratyphi* pada konsentrasi 400 µg/disk memberikan hasil sebesar  $7,0 \pm 0,50$  mm, sedangkan ekstrak metanol buah belimbing wuluh memberikan Konsentrasi Hambat Minimum sebesar  $23,0 \pm 0,50$  mm. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi antibakteri fraksi buah belimbing wuluh untuk memisahkan kandungan senyawa dalam buah belimbing wuluh berdasarkan polaritas. Buah belimbing wuluh mengandung senyawa kimia berupa flavonoid, saponin, triterpenoid, dan tanin (Nuru *et al* 2009).

Flavonoid, saponin dan tanin merupakan senyawa polar yang memiliki aktivitas antibakteri dengan merusak membran sitoplasma yang menyebabkan bocornya metabolit penting dan menginaktifkan sistem enzim bakteri (Ardananuridin *et al* 2004). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah dengan mengerutkan dinding sel bakteri sehingga dapat mengganggu permeabilitas sel. Terganggunya permeabilitas sel dapat menyebabkan sel tersebut tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat ( Anggraini & Saputra 2016). Triterpenoid merupakan senyawa non polar yang bekerja sebagai antibakteri dengan merusak membran sel bakteri. Kerusakan membran sel dapat terjadi ketika senyawa aktif antibakteri bereaksi dengan sisi aktif dari membran atau dengan melarutkan konstituen lipid dan meningkatkan permeabilitasnya. Membran sel bakteri terdiri dari fosfolipid dan molekul protein. Akibat peningkatan permeabilitas, senyawa antibakteri dapat masuk ke dalam sel. Ketika di dalam sel, senyawa tersebut dapat melisis membran sel atau mengkoagulasi sitoplasma dari sel bakteri tersebut (Adewoye *et al.* 2010).

Penelitian uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air dari ekstrak metanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap bakteri *S. dysenteriae* dilakukan untuk mengetahui manakah fraksi yang memiliki aktivitas paling efektif dalam menghambat bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361.

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dapat dirumuskan suatu masalah yaitu :

Pertama, apakah fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air dari ekstrak metanol buah belimbing wuluh (*A. bilimbi L.*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. dysenteriae* ATCC 9361 ?

Kedua, dari ketiga fraksi ekstrak metanol buah belimbing wuluh (*A. bilimbi L.*) tersebut manakah yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dalam menghambat *S. dysenteriae* ATCC 9361 ?

## **C. Tujuan Penelitian**

Pertama, untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air dari ekstrak metanol buah belimbing wuluh (*A. bilimbi L.*) dalam menghambat *S. dysenteriae* ATCC 9361.

Kedua, untuk mengetahui aktivitas antibakteri paling efektif di antara fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air ekstrak buah belimbing wuluh (*A. bilimbi L.*) sebagai antibakteri dalam menghambat *S. dysenteriae* ATCC 9361.

## **D. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang manfaat buah belimbing wuluh sebagai alternatif pengobatan antibakteri dan dapat memberikan tambahan ilmu pengetahuan dalam pengembangan tanaman obat baru.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### A. Tanaman Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L)

#### 1. Sistematika Tanaman



Gambar 1. Buah belimbing wuluh (Harapan 2015).

Menurut Dasuki (1991), sistematika tanaman belimbing wuluh adalah sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*  
Divisio : *Magnoliophyta*  
Kelas : *Magnoliopsida*  
Ordo : *Geraniales*  
Familia : *Oxalidaceae*  
Genus : *Averrhoa*  
Spesies : *Averrhoa bilimbi*

## 2. Nama Lain

Belimbing wuluh di Indonesia memiliki nama berbeda-beda tiap daerahnya, seperti di Aceh belimbing wuluh di kenal dengan limeng, selimeng, thlimeng, di Jawa blimbing wuluh, di Madura dikenal dengan bhalingbhing, di Bali dikenal dengan blimbing buloh, di Gorontalo dikenal dengan lembitue, di Maluku dikenal dengan taprera, di Irian dikenal dengan utekee (Hariana 2005).

## 3. Morfologi Tanaman

Belimbing wuluh memiliki pohon kecil, tinggi mencapai 10 m dengan batang yang tidak begitu besar dan mempunyai garis tengah hanya sekitar 30 cm. Ditanam sebagai pohon buah, kadang tumbuh liar dan ditemukan dari dataran rendah sampai 500 m dpl. Belimbing wuluh mempunyai batang kasar berbenjol-benjol, percabangan sedikit, arahnya condong ke atas. Cabang muda berambut halus seperti beludru, warnanya coklat muda. Daun berupa daun majemuk menyirip ganjil dengan 21-45 pasang anak daun. Anak daun bertangkai pendek, bentuknya bulat telur sampai jorong, ujung runcing, pangkal membulat, tepi rata, panjang 2-10 cm, lebar 1-3 cm, warna hijau, permukaan bawah hijau muda. Perbungaan berupa malai, berkelompok, keluar dari batang atau percabangan yang besar, bunga kecil-kecil berbentuk bintang, berwarna ungu kemerahan. Buah berbentuk bulat lonjong bersegi, panjang 4-6,5 cm, warna hijau kekuningan, bila masak berair banyak, rasanya asam. Biji berbentuk bulat telur, pipih. Belimbing wuluh dapat diperbanyak dengan biji dan cangkok (Depkes 1995).

## 4. Kandungan Kimia

Kandungan kimia pada batang belimbing wuluh adalah saponin, tanin, glukosida, kalsium oksalat, sulfur, asam format, peroksida. Daun mengandung tanin, sulfur, asam format, peroksida, kalium oksalat. Menurut Oktadoni S, Nur A (2016), identifikasi golongan pada ekstrak etanol dari buah belimbing wuluh menunjukkan adanya senyawa flavonoid, saponin, triterpenoid, dan tanin.

**4.1. Flavonoid.** Flavonoid adalah senyawa polifenol yang banyak terdapat di alam. Flavonoid merupakan golongan senyawa bahan alam dari senyawa fenolik yang merupakan pigmen tumbuhan. Flavonoid terdapat pada

grup-grup dari unsur-unsur polifenol yang terdapat pada kebanyakan tumbuhan, biji, kulit buah, kulit kayu, dan bunga. Sejumlah besar tumbuhan obat mengandung flavonoid. Flavonoid digolongkan berdasarkan struktur kimianya, menjadi flavonol, flavon, flavanon, isoflavon, *anthocyanidin*, dan khalkon (Yulianan 2014).

Flavonoid umumnya larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, air dan lain-lain. Flavonoid mempunyai efek farmakologi sebagai antibakteri. Mekanisme kerja flavonoid yaitu mendenaturasi protein sel dan mengerutkan dinding sel sehingga dapat melisiskan dinding sel bakteri (Prihatini 2015).

**4.2. Triterpenoid.** Triterpenoid adalah senyawa metabolit sekunder yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan diturunkan dari hidrokarbon C 30 asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini berbentuk siklik atau asiklik dan sering memiliki gugus alkohol, aldehyd, atau asam karboksilat. Senyawa triterpenoid bekerja sebagai antifungi, insektisida, antibakteri dan antivirus (Widiyati 2006).

**4.3. Saponin.** Saponin adalah senyawa aktif dengan permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika dikocok dengan air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Dua jenis saponin yang dikenal yaitu glikosida triterpenoid lakohol dan glikosida struktur steroid. Kedua jenis saponin ini larut dalam air dan etanol namun tidak larut dalam eter (Prihatini 2015). Mekanisme kerja saponin yaitu dengan menurunkan tegangan permukaan sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Puspitasari 2009).

**4.4. Tanin.** Tanin merupakan gambaran secara umum untuk golongan polimer fenolik, biasanya ditemukan pada bagian kuncup, batang, daun, buah, dan akar. Tanin ditandai oleh sifatnya yang dapat mengendapkan protein dari larutan dengan membentuk senyawa yang tidak larut (Prihatini 2015).

## 5. Manfaat Tanaman

Tanaman belimbing wuluh memiliki buah yang biasa untuk bumbu masak dan dapat digunakan sebagai obat sariawan, daunnya berkhasiat sebagai obat encok, obat penurun panas dan obat gondok (Depkes 1995).

## 6. Perkembangan Penelitian Buah Belimbing Wuluh

Penelitian yang dilakukan oleh Lathifah (2008) membuktikan bahwa ekstrak etanol buah belimbing wuluh memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Diameter zona hambat yang dihasilkan dengan konsentrasi tertinggi sebesar 450 mg/ml pada masing-masing bakteri adalah 19,0 mm, dan 13,0 mm, sedangkan konsentrasi terendah sebesar 100 mg/ml menghasilkan diameter zona hambat sebesar 2,33 mm, dan 3,67 mm.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Das *et al* (2011) ekstrak metanol daun dan buah belimbing wuluh memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif. Pada penelitian tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri dari buah belimbing wuluh memiliki potensi lebih besar dari pada daunnya. Hasil ekstrak metanol buah belimbing wuluh pada konsentrasi 400 µg/disk memberikan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) terhadap *Salmonella typhi* sebesar 20,0 mm, sedangkan ekstrak metanol dari daun belimbing wuluh pada konsentrasi 400 µg/disk hanya memberikan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) sebesar 6,0 mm.

Penelitian lain terhadap buah belimbing wuluh sebagai antibakteri dilakukan oleh Rahmiati *et al* (2017). Dalam penelitian tersebut, ekstrak etanol buah belimbing wuluh memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *S. epidermidi*. Berdasarkan data dari penelitian tersebut, daya hambat ekstrak etanol buah belimbing wuluh terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 40% b/v sebesar 30,0 mm, sedangkan pada bakteri *S. epidermidi* sebesar 35,0 mm dengan konsentrasi yang sama.

## **B. Metode Penyarian**

### **1. Simplisia**

Simplisia adalah bahan-bahan obat alam yang masih berada dalam wujud aslinya atau belum mengalami perubahan bentuk. Simplisia dibagi menjadi tiga golongan, yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan/mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang dapat berupa tanaman utuh, bagian tanaman, eskudat tanaman, atau gabungan antara ketiganya. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa bahan kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa bahan kimia murni (Gunawan & Mulyani 2004).

### **2. Pengeringan**

Pengeringan bertujuan menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi khapang dan bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang dapat menguraikan lebih lanjut kandungan zat aktif dan memudahkan dalam hal pengelolaan proses selanjutnya. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses pengeringan yaitu waktu pengeringan, suhu pengeringan, kelembapan udara dan kelembapan bahan, ketebalan bahan, sirkulasi udara dan luas permukaan bahan (Gunawan & Mulyani 2004).

### **3. Ekstraksi**

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair (Depkes RI 2000). Kelarutan dan stabilitas senyawa pada simplisia terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat, dan derajat keasaman dipengaruhi oleh struktur kimia yang berbeda-beda. Cara ekstraksi dengan menggunakan pelarut ada dua jenis yaitu cara dingin dan panas. Cara dingin terdiri dari maserasi dan perkolasi, sedangkan cara panas antara lain refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok ( Depkes RI 2000).



#### **4. Perkolasi**

Metode perkolasi merupakan cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Prinsip perkolasi adalah serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat aktif sel-sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh. Untuk menentukan akhir perkolasi, dapat dilakukan pemeriksaan zat aktif secara kualitatif pada perkolat terakhir yaitu penentuan dengan cara organoleptis seperti bau, warna dan bentuknya. Cara perkolasi lebih baik dibandingkan dengan cara maserasi karena aliran cairan penyari menyebabkan adanya pergantian larutan yang terjadi dengan larutan yang konsentrasinya lebih rendah, sehingga meningkatkan derajat perbedaan konsentrasi serta ruangan diantara butir-butir serbuk simplisia membentuk saluran tempat mengalir cairan penyari, karena kecilnya saluran kapiler tersebut, maka kecepatan pelarut cukup untuk mengurangi lapisan batas, sehingga dapat meningkatkan perbedaan konsentrasi (Depkes 1986), kelebihan dari metode ini adalah sampel selalu dialiri oleh pelarut baru, sedangkan kerugian metode ini yaitu membutuhkan banyak pelarut dan memakan waktu (Prihatini 2014).

#### **5. Fraksinasi**

Fraksinasi adalah suatu cara untuk memisahkan golongan utama dari suatu golongan utama yang lain berdasarkan polaritas. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan tersebut. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar. Keuntungan fraksinasi adalah diperolehnya isolat atau senyawa yang lebih spesifik terhadap polaritas pelarut yang digunakan ( Harbone 2007).

#### **6. Larutan Penyari**

larutan penyari yang akan di gunakan harus memenuhi kriteria yaitu murah, mudah diperoleh, stabil secara fisikia dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap maupun terbakar, serta bersifat selektif yaitu hanya menarik zat yang dikehendaki. Dalam penelitian ini pelarut yang digunakan untuk ekstraksi

adalah metanol dan fraksinasi dengan *n*-heksana, kloroform, dan air. Kandungan senyawa yang terdapat dalam buah belimbing wuluh mempunyai polaritas berbeda-beda, sehingga fraksinasi dengan pelarut yang memiliki polaritas yang berbeda akan memisahkan senyawa-senyawa tersebut.

**6.1. Metanol.** Metanol merupakan bentuk alkohol paling sederhana, metanol juga dikenal sebagai metil alkohol. Pada keadaan atmosfer metanol berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan dari pada etanol). Pelarut metanol banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam (Susanti *et al* 2012).

**6.2. *n*-heksana.** *n*-heksana merupakan pelarut non polar berupa cairan jernih, tidak berwarna, dapat tercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar dan mempunyai bau seperti eter lemah. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa non polar, misalnya golongan minyak atsiri, lemak, asam lemak tinggi, steroid dan golongan triterpenoid (Robinson 1995).

**6.3. Kloroform.** Kloroform adalah nama umum untuk triklorometana, mengandung etanol 1,0% v/v sampai 2,0% v/v sebagai zat penstabil, larut dalam lebih kurang 200 bagian air, mudah larut dalam etanol mutlak P, dalam eter P, dalam sebagian besar pelarut organik, dalam minyak atsiri, dan dalam minyak lemak. Kloroform berupa cairan mudah menguap, bau khas, rasa manis dan membakar, dan tidak berwarna. Bobot per mililiter 1,474 gram sampai 1,479 gram. Jarak titik didih lebih dari 5,0% v/v tersuling pada suhu dibawah 60<sup>0</sup>C, sisa tersuling pada suhu antara 60<sup>0</sup>C dan 62<sup>0</sup>C (Anonim 1979). Kloroform merupakan pelarut organik yang mampu memisahkan lipid dan terpenoid (Harborne 1987).

**6.4. Air.** Air dipertimbangkan sebagai pelarut karena stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun, dan alamiah. Air melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tanin, dan gula, juga melarutkan gom, pati, protein, lendir, enzim, lilin, lemak, pektin, zat warna dan asam organik. Air dapat melarutkan enzim sehingga enzim yang terlarut dengan adanya air akan menyebabkan reaksi enzimatik, yang mengakibatkan penurunan mutu, tetapi adanya air akan mempercepat proses hidrolisis. Penggunaan air sebagai cairan

penyari kurang menguntungkan disamping zat aktif ikut tersari juga zat lain yang tidak diperlukan mengganggu proses penyarian (Depkes 1986).

### ***C. Shigella dysenteriae***

#### **1. Klasifikasi *Shigella dysenteriae***

Sistematika bakteri *Shigella dysenteriae* sebagai berikut (Jawetz *et al* 2005) :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Protobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: Shigella
Spesies	: <i>Shigella dysenteriae</i>

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

*S. dysenteriae* adalah bakteri Gram-negatif yang memiliki morfologi batang ramping, tidak berkapsul, tidak membentuk spora, bentuk *Coccobacilli* terjadi pada perbenihan muda. *S. dysenteriae* merupakan bakteri anaerob fakultatif, tetapi tumbuh paling baik pada kondisi aerob. Memiliki bentuk koloni cembung, bundar, transparan, dan tepi berbatas tegas, mencapai diameter sekitar 2 mm dalam 24 jam. Bakteri ini memfermentasikan glukosa tapi tidak memfermentasikan mannitol dan ornitin dekarboksilase. *Shigella sp.* mempunyai susunan antigen yang kompleks. Terdapat banyak tumpang tindih dalam sifat serologik berbagai spesies, sebgaaian besar memiliki antigen O yang juga dimiliki oleh bakteri enterik lainnya, antigen somatik O dari bakteri ini adalah lopolisakarida. Pembeda serologiknya tergantung pada polisakarida. Klasifikasi *Shigella sp.* didasarkan pada sifat-sifat biokimia dan karakteristik antigen (Jawetz *et al* 2010).

#### **3. Patogenesis**

*S. dysenteriae* menyebabkan shigellosis atau disebut juga disentri basiler, yaitu suatu infeksi peradangan akut saluran pencernaan yang ditandai dengan peradangan usus, terutama kolon dan disertai nyeri perut, tenesmus, dan buang air besar yang sering mengandung darah dan mukus. Bakteri *S. dysenteriae* masuk ke

dalam tubuh melalui air dan makanan yang telah tercemar. Habitat alamiah bakteri disentri adalah usus besar manusia, infeksi *S. dysenteriae* praktis selalu terbatas pada saluran pencernaan, dan invasi bakteri ke dalam darah sangat jarang. Dosis infeksi bakteri ini kurang dari  $10^3$  organisme dan merupakan golongan *Shigella sp.* yang cenderung resisten terhadap antibakteri (Jawetz *et al* 2010).

#### **4. Pengobatan**

Terapi antimikroba diberikan untuk mempersingkat berlangsungnya penyakit dan penyebaran bakteri. Antibiotik terpilih untuk infeksi *shigella* adalah ciprofloksasin, ampisilin, tetrasiklin, dan kotrimoksazol (Jawetz *et al* 2010). Ciprofloksasin adalah pengobatan lini pertama untuk mengatasi infeksi *S. dysenteriae* menurut WHO. Ciprofloksasin merupakan antibiotik berpektrum luas sehingga efektif untuk melawan bakteri gram positif maupun negatif. Terapi dengan radiasi yang adekuat secara oral atau intravena, tergantung dari keparahan penyakit. Masalah resistensi kuman *S. dysenteriae* terhadap antibiotik bukanlah merupakan suatu hal yang baru. *Shigella* yang resistensi terhadap antibiotik adalah sebagai akibat dari pemakaian antibiotik yang tidak rasional.

### **D. Media**

#### **1. Pengertian Media**

Media merupakan bahan yang terdiri dari zat-zat kimia organik dan anorganik yang telah melalui proses pengolahan dapat digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme. Media yang digunakan harus memenuhi syarat yaitu harus mengandung unsur-unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba, mempunyai tekanan osmose dan pH yang sesuai. Keasaman (pH) media amat penting bagi pertumbuhan organisme terutama kerja enzim yang mana sangat dipengaruhi oleh pH (Suriawiria 1986).

#### **2. Klasifikasi Media**

Media adalah suatu bahan yang digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangbiakan bakteri. Suatu bentuk media ditentukan oleh ada tidaknya penambahan zat pematat seperti agar-agar, gelatin, dan sebagainya, maka bentuk media dikenal ada tiga jenis.

**2.1. Media padat.** Media padat merupakan penambahan dari 12-15 gram tepung agar-agar per 1000 ml media. Jumlah tepung agar-agar yang ditambahkan tergantung pada jenis dan kelompok mikroba yang ditambahkan. Jenis media yang membutuhkan kadar air rendah, penambahan agar-agar harus sedikit. Media padat umumnya digunakan untuk bakteri, jamur, ragi, dan kadang-kadang mikroalga (Suriawiria 1986).

**2.2. Media cair.** Media cair tidak ditambahkan zat pematat, karena biasanya dipergunakan untuk perbaikan mikroalga dan mikroba lain, terutama bakteri dan ragi (Suriawiria 1986).

**2.3. Media semi cair atau semi padat.** Zat pematat yang ditambahkan pada media hanya 50% atau kurang dari yang seharusnya. Media semi cair atau semi padat umumnya digunakan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup aerobik atau fakultatif (Suriawiria 1986).

### **E. Sterilisasi**

Tindakan untuk membebaskan alat atau bahan dari jasad renik disebut dengan sterilisasi. Sterilisasi sangat diutamakan dalam bidang mikrobiologi, baik alat-alat yang digunakan maupun medianya, dikatakan steril apabila alat dan bahan tersebut bebas dari mikroba, baik dalam bentuk vegetatif maupun sporanya. Terdapat beberapa cara sterilisasi yang dikenal dan pemilihan cara sterilisasi tergantung dari bahan dan alat yang akan disterilisasi. Tindakan sterilisasi yang dilakukan yaitu pertama, sterilisasi secara fisik, misalnya dengan pemanasan, penggunaan sinar bergelombang pendek, seperti sinar UV dan dengan radiasi. Kedua, sterilisasi secara kimia, adalah sterilisasi dengan menggunakan bahan kimia misalnya menggunakan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin. Ketiga, sterilisasi secara mekanik menggunakan saringan atau filter dengan pori-pori halus sehingga dapat menahan suatu bakteri (Suriawiria 1986).

## F. Antibakteri

### 1. Definisi Antibakteri

Antibakteri adalah suatu bahan atau senyawa kimia yang mampu menghambat pertumbuhan maupun membunuh mikroorganisme (Jawetz *et al* 1986). Aktivitas antimikroba dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, konsentrasi atau intensitas zat antimikroba, kepekaan suatu mikroba terhadap konsentrasi antibakteri, jumlah mikroorganisme, dan potensi suatu zat antimikroba dalam larutan yang diuji (Pelczar *et al* 1986).

### 2. Mekanisme Antibakteri

Antibakteri yaitu suatu obat yang dapat menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, antibakteri ada yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan membunuh bakteri (bakterisid). Antibakteri yang ideal memiliki toksisitas selektif, yaitu antibakteri tersebut hanya berbahaya bagi bakteri, tetapi relatif tidak membahayakan bagi hospes (Pelczar *et al* 1986). Mekanisme kerja antibakteri dapat dikelompokkan sebagai berikut:

**2.1. Menghambat sintesis dinding sel bakteri.** Salah satu kerja antibakteri adalah menghambat sintesis dinding sel, dinding sel bakteri terdiri atas peptidoglikan. Sintesis peptidoglikan akan dihalangi oleh adanya antibiotik seperti penicillin, sefalosporin, basitrasin, sikloserin. Antibiotik ini akan menghambat proses sintesis peptidoglikan sehingga dinding sel menjadi tidak sempurna dan tidak mempertahankan pertumbuhan sel secara normal, tekanan osmotik dalam sel bakteri lebih tinggi daripada tekanan di luar sel maka kerusakan dinding sel bakteri menyebabkan lisis (Setiabudy dan Gan 1995).

**2.2. Mengganggu permeabilitas membran sel bakteri.** Membran sel pada bakteri memiliki sifat permeabilitas selektif dan berfungsi mengontrol keluar masuknya substansi dari dalam dan luar sel, apabila terjadi kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel (Pelczar dan Chan 1986). Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah polimiksin, golongan polien serta berbagai antibakteri kemoterapeutik. Antibiotik polien bereaksi dengan struktur sterol yang terdapat pada membran sel fungus

sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran tersebut. Antiseptik yang mengubah tegangan permukaan (*surface active agents*), dapat merusak permeabilitas selektif dari membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain (Akhyar 2010).

**2.3. Menghambat metabolisme sel bakteri.** Bakteri membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, berbeda dengan mamalia yang mendapat asam folat dari luar, kuman patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA). Kerja antibakteri dari golongan ini adalah menghambat pembentukan asam folat. Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini adalah sulfonamid, trimetropim, asam p-aminosalisilat dan sulfon. Sulfonamid dan sulfon bekerja dengan bertindak sebagai inhibitor kompetitif terhadap enzim dihidropteroate sintetase (DHPS). Dengan dihambatnya enzim DHPS ini menyebabkan tidak terbentuknya asam tetrahidrofolat bagi bakteri. Tetrahidrofolat merupakan bentuk aktif dari asam folat (Setiabudy dan Gan 1995).

**2.4. Menghambat sintesis protein sel bakteri.** Sel mikroba perlu mensintesis berbagai protein, sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri dari dua sub unit yaitu ribosom 30S dan 50S, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Antibiotik yang bekerja menghambat sintesis protein sel bakteri antara lain golongan aminoglikosida, kamrolid, linkomisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol. Penghambatan sintesis protein pada bakteri terjadi dengan berbagai cara, macrolid meliputi eritromisin dan azitromisin menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara berikatan pada sub unit 50S ribosom, sehingga dengan demikian akan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptide, rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru. Tetrasiklin berikatan dengan sub unit 30S ribosom dan mencegah pengikatan aminoasil-tRNA dari situs A pada ribosom, sehingga akan menghambat translasi protein (Akhyar 2010).

**2.5. Menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri.** Protein, DNA, dan RNA memiliki peran penting dalam proses kehidupan normal sel bakteri. Salah satu mekanisme kerja antibakteri yang lain adalah berikatan dengan enzim polimerase RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut (Ganiswara 1995).

### **G. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri**

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

Metode difusi adalah suatu uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan suatu cakram yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada pembedihan padat yang telah ditanami dengan biakan bakteri uji. Setelah inkubasi garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri uji (Jawetz *et al* 2005).

#### **2. Metode Dilusi**

Metode dilusi menggunakan antibakteri yang dicampurkan dalam pembedihan mikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat, kemudian media dan bakteri diinkubasi mencari kadar hambat dan kadar bunuh minimal yaitu kadar obat terendah yang dapat menghambat dan membunuh pertanaman bakteri. Keuntungan metode dilusi adalah dapat diketahui KHM dan KBM (Jawetz *et al* 2001). Harga KHM ditentukan berdasarkan kadar terendah larutan uji yang menghasilkan larutan yang jernih setelah dilakukan inkubasi. Harga KBM ditentukan dengan mengamati ada tidaknya pertumbuhan koloni hasil goresan larutan uji pada media agar. Kadar terendah yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri dinyatakan sebagai KBM. Kekurangan metode ini adalah memerlukan waktu yang relatif lama, tidak praktis, dan sampel yang digunakan untuk penelitian harus jernih (Jawetz *et al* 2001).



## H. Landasan Teori

*S. dysenteriae* merupakan bakteri Gram negatif yang bersifat patogen karena menghasilkan endotoksin dan eksotoksin, dimana keduanya bekerja secara berurutan. Eksotoksin menyebabkan diare akut dan tidak disertai darah pada tinja, kemudian invasi pada usus besar yang disebabkan endotoksin sehingga terjadi disentri. *S. dysenteriae* memiliki morfologi batang ramping, tidak berflagel, tidak berkapsul, dan tidak membentuk spora. *S. dysenteriae* merupakan bakteri anaerob fakultatif, tetapi tumbuh paling baik pada kondisi aerob. Habitat alami bakteri *S. dysenteriae* adalah di usus besar manusi, sehingga infeksi *Shigella* praktis terbatas pada saluran cerna (Tiram 2016; Jawetz *et al* 2010).

Disentri atau shigellosis adalah penyakit infeksi saluran pencernaan yang disebabkan oleh bakteri *S. dysenteriae*, ditandai dengan diare cair akut, tinja pada penderita penyakit diketahui mengandung darah dengan atau tanpa lendir, disentri biasanya disertai dengan demam, nyeri perut, anoreksia, dan tenesmus. Disentri merupakan penyakit yang mudah menular, penyakit ini masuk ke dalam tubuh melalui air dan makanan yang telah tercemar bakteri disentri yang dikonsumsi (Tiram 2016; WHO 2005).

Terapi antimikroba diberikan untuk mempersingkat berlangsungnya penyakit dan penyebaran bakteri. Antibiotik terpilih untuk infeksi *shigella* adalah ciprofloksasin, ampisilin, tetrasiklin, dan kotrimoksazol, namun kasus resistensi dari *Shigella* terhadap antibiotik tersebut telah menyebar luas. Adanya resistensi terhadap antibiotik mendorong dilakukannya penelitian untuk mencari alternatif pengobatan lain yang lebih aman, misalnya penggunaan tanaman yang memiliki potensi sebagai antibiotik.

Penggunaan tanaman sebagai obat tradisional telah dilakukan sejak berabad-abad yang lalu, namun kebanyakan informasi yang ada hanya sebatas bukti empiris belum ada bukti ilmiah. Pengobatan tradisional dengan tanaman obat dinilai lebih aman dari pada penggunaan obat modern, hal ini dikarenakan obat tradisional memiliki efek samping yang relatif lebih kecil dari pada obat modern (Juliantina *et al* 2008).

Tanaman belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) merupakan salah satu spesies tanaman Indonesia yang pada umumnya banyak ditanam di dalam pekarangan, baik digunakan sebagai bumbu masak maupun hanya sebagai peneduh di dalam rumah (Parikesit 2011). Tanaman belimbing wuluh dikenal sebagai tanaman obat. Daun sebagai obat encok, diabetes, sakit perut, rematik, penurun panas dan obat gondok. Sebagian masyarakat Indonesia juga memanfaatkan belimbing wuluh sebagai pengawet ikan (Sari & Suryani 2014).

Penelitian efek antibakteri pada belimbing wuluh pernah dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*, ekstrak etanol buah belimbing wuluh pada konsentrasi masing-masing 10 % b/v; 20 % b/v; 30 % b/v; dan 40 % b/v mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan rata-rata diameter zona hambat 21,6 mm; 27,0 mm; 31,3 mm; dan 34,0 mm. Pada bakteri *S. epidermidis* memberikan rata-rata diameter zona hambat masing-masing sebesar 28,6 mm; 31,6 mm; 36,3 mm; 39,0 mm (Rahmiati *et al* 2017)

Fraksinasi adalah suatu cara untuk memisahkan suatu golongan senyawa utama dengan golongan senyawa utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa non polar dan senyawa semi polar akan masuk ke pelarut non polar dan pelarut semi polar. Pelarut yang digunakan untuk fraksinasi dalam penelitian ini adalah *n*-heksana, kloroform dan air. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa nonpolar misalnya minyak atsiri, asam lemak, triterpenoid dan steroid. Kloroform dapat melarutkan senyawa semipolar misalnya alkaloid, flavonoid, dan terpenoid. Air merupakan senyawa polar yang stabil, senyawa yang dapat larut dalam air adalah tanin, alkaloid, flavonoid, minyak penguap, pati, protein, lendir, zat pewarna, dan asam organik (Depkes 1986). Tanin, flavonoid, triterpenoid diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Das *et al* 2011).

Pengujian aktivitas antibakteri dalam penelitian ini menggunakan metode difusi. Khasiat antibakteri ekstrak metanol buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) diuji dengan metode difusi agar dengan baik (Das *et al* 2011). Sebagai kontrol positif dalam penelitian ini digunakan kotrimoksazol. Kotrimoksazol merupakan kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol yang menghambat reaksi enzimatik

obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi kedua obat memberikan efek sinergi (Gunawan 1995).

### **I. Hipotesis**

Berdasarkan permasalahan dan landasan teori yang ada, dapat disusun suatu hipotesis dalam penelitian ini, yaitu:

Pertama adalah, fraksi *n*-heksana, kloroform dan air dari ekstrak metanol buah belimbing wuluh mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. dysenteriae* ATCC 9361.

Kedua, dari ketiga fraksi ekstrak metanol buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) yang mempunyai aktivitas paling efektif dalam menghambat *S. dysenteriae* ATCC 9361 yaitu fraksi kloroform.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) yang berasal dari desa Panjangsari Baru, Kecamatan Parakan, Kabupaten Temanggung, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.). Buah belimbing wuluh yang digunakan berupa buah yang matang, bebas hama, serta masih dalam keadaan segar. Buah belimbing wuluh ini diperoleh dari desa Panjangsari Baru, Kecamatan Parakan, Kabupaten Temanggung, Jawa Tengah.

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

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

Variable utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) yang diekstraksi secara perkolasi menggunakan larutan penyari metanol dilanjutkan dengan fraksinasi yang menggunakan *n*-heksana, kloroform, dan air.

Variable utama yang kedua adalah uji aktivitas antibakteri hasil ekstrak terhadap *S. dysenteriae* ATCC 9361.

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

Variable utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel kendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air dari ekstrak buah belimbing wuluh yang diuji antibakteri dengan berbagai konsentrasi.

Variabel tergantung merupakan variabel akibat dari variabel utama, variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter hambat dan pertumbuhan bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu dinetralkan atau ditetapkan kualitasnya agar hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air dari ekstrak metanol buah belimbing wuluh, bakteri uji *S. dysenteriae* ATCC 9361, kondisi peneliti, kondisi laboratorium, media yang digunakan.

### 3. Definisi operasional variabel

Pertama, buah belimbing wuluh diambil pada bulan Februari 2018 dari desa Panjangsari Baru, Kecamatan Parakan, Kabupaten Temanggung, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk buah belimbing wuluh didapat dari buah belimbing wuluh yang diambil lalu dicuci dengan air mengalir. Tujuan dari pencucian ini untuk menghilangkan kotoran. Pengeringan dilakukan dengan oven pada suhu 40°C selama 24 jam kemudian dihaluskan serta diayak dengan ayakan no 40.

Ketiga, ekstrak metanol buah belimbing wuluh adalah hasil ekstraksi serbuk buah belimbing wuluh dengan pelarut metanol menggunakan metode perkolasi.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah ekstrak buah belimbing wuluh yang ditambah pelarut air kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana.

Kelima, fraksi kloroform adalah residu dari ekstrak buah belimbing wuluh yang difraksinasi dengan *n*-heksana, yang kemudian difraksinasi dengan pelarut kloroform.

Keenam, fraksi air dari ekstrak buah belimbing wuluh adalah residu dari fraksi kloroform.

Ketujuh, bakteri yang digunakan dalam penelitian yaitu *S. dysenteriae* ATCC 9361 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi. Metode difusi untuk mengukur luas daerah hambat yaitu daya hambat fraksi

terhadap pertumbuhan *S. dysenteriae* ATCC 9361, kontrol negatif adalah DMSO 1%, dan kontrol positif adalah kotrimoksazol.

### C. Bahan dan Alat

#### 1. Bahan

**1.1 *Bahan sampel.*** Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah belimbing wuluh diambil buah yang berwarna hijau, bebas hama, serta masih dalam keadaan segar. Buah belimbing wuluh diperoleh dari desa Panjangsari Baru, Kecamatan Parakan, Kabupaten Temanggung, Jawa Tengah.

**1.2 *Bahan kimia.*** Bahan kimia yang digunakan adalah media Bismuth Sulfide Agar (BSA), Endo Agar (EA), Mueller Hinton Agar (MHA), Sulfide Indol Motility (SIM), Klinger Iron Agar (KIA), Lysine Iron Agar (LIA), Gram A (kristal violet), Gram B (larutan lugol), Gram C (alkohol 96%), Gram D (safranin). pelarut yang digunakan metanol, *n*-heksana, kloroform, aquadest steril, larutan Mayer, larutan Dragendrof, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, CH<sub>3</sub>COOH, FeCl<sub>3</sub> 1%.

**1.3 *Bakteri uji.*** Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361.

#### 2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat untuk membuat simplisia seperti pisau, timbangan, oven, blender, ayakan no 40. Alat penyari yang digunakan adalah seperangkat alat perkolasi. Alat untuk uji aktivitas antibakteri seperti tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, kapas lidi steril, kotak septis inkas, pembakar spirtus, mikroskop, obyek glass, deck glass, gelas ukur, pipet ukur, spluit.

### D. Jalannya Penelitian

#### 1. Determinasi Tanaman

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi buah belimbing wuluh yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel buah belimbing wuluh yang dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada buah belimbing wuluh yang dibuktikan di Universitas Setia Budi Surakarta.

## **2. Pengambilan Sampel**

Buah belimbing wuluh yang diambil yaitu yang berwarna hijau serta bebas hama. buah belimbing wuluh ini diperoleh dari desa Panjangsari Baru, Kecamatan Parakan, Kabupaten Temanggung, Jawa Tengah pada bulan Desember 2017.

## **3. Pengeringan Bahan**

Bahan yang akan dikeringkan dicuci bersih dengan air mengalir dan ditiriskan, setelah itu dipotong-potong kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C.

## **4. Pembuatan Serbuk**

Pembuatan serbuk buah belimbing wuluh dilakukan dengan cara diblender dan diayak dengan ayakan no 40, kemudian dilakukan perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah buah belimbing wuluh.

## **5. Penetapan Kadar Air**

Penetapan kadar air serbuk buah belimbing wuluh dilakukan dengan alat *Sterling-Bidwel*. Metode penetapan susut pengeringan serbuk buah belimbing wuluh dilakukan dengan cara menimbang serbuk buah belimbing wuluh sebanyak 20 gram, dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xylen sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwel*, lalu dipanaskan dengan api kecil, setelah mendidih apinya dibesarkan. Pemanasan dihentikan bila pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes, kemudian diukur kadar airnya dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwel* dengan melihat volume pada skala alat tersebut.

## **6. Pembuatan Ekstrak Metanolik Buah Belimbing Wuluh**

Pembuatan ekstrak metanol buah belimbing wuluh dilakukan dengan metode perkolasi yang dilakukan dengan cara membasahi 500 mg serbuk simplisia dengan 250 ml metanol kemudian dimasukkan dalam bejana tertutup selama 3 jam, kemudian masa dipindahkan sedikit demi sedikit dalam perkolator sambil ditekan dan dituangkan cairan pelarut sampai tergenang selapis cairan diatas permukaan serbuk. Perkolator ditutup dan dibiarkan selama 24 jam, cairan dibiarkan menetes dengan kecepatan 1 ml/menit, tambahkan metanol berulang-

ulang secukupnya sehingga selalu terdapat selapis cairan penyari di atas simplisia. Hentikan ekstraksi apabila pada perkolat sudah tidak meninggalkan residu berwarna putih pada saat dipekatkan (Depkes 1979).

### **7. Uji Bebas Metanol**

Pemeriksaan bebas metanol terhadap ekstrak buah belimbing wuluh bertujuan untuk memastikan bahwa ekstrak bebas dari metanol. Uji dilakukan dengan cara ekstrak ditambah dengan asam asetat pekat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Hasil positif apabila tidak terdapat bau ester yang khas dari alkohol (Praeparandi 2006).

### **8. Fraksinasi**

Ekstrak kental buah belimbing wuluh difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan, kloroform dan air. Fraksinasi dengan *n*-heksan, fraksinasi dari ekstrak buah belimbing wuluh dibuat dengan menimbang ekstrak hasil perkolasi sebanyak 10 gram, dilarutkan dalam 75 ml air, kemudian dimasukkan dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut *n*-heksan 75 ml dengan dilakukan fraksinasi 3 kali. Fraksi *n*-heksan berada dibagian atas dan fraksi air berada dibagian bawah. Fraksi *n*-heksan yang didapat dipekatkan dengan menggunakan evaporator dengan suhu di bawah 50°C.

Residu dari fraksi *n*-heksan dilanjutkan fraksinasi sebanyak 3 kali dengan pelarut kloroform. Fraksi kloroform berada dibagian atas sedangkan fraksi air berada dibagian bawah. Fraksi kloroform dipekatkan dengan evaporator pada suhu di bawah 50°C dan fraksi air dipekatkan dengan *water bath*.

### **9. Identifikasi Kandungan Kimia**

Identifikasi kandungan kimia digunakan untuk menguji kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam buah belimbing wuluh. Identifikasi senyawa flavonoid, saponin, triterpenoid, dan tanin dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi. Identifikasi kandungan kimia yang akan dilakukan meliputi :

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara : 2 gram serbuk dan fraksi ditambah metanol kemudian dipanaskan selama 10 menit, dipisahkan filtrat dan



ditambahkan HCl, logam Mg, dan amil alkohol. Flavonoid positif apabila larutan berwarna merah (Harbone 1987).

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan cara : 0,5 gram serbuk, dan fraksi dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang mantap dengan tinggi 1 sampai 10 cm, tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan asam klorin 2N menunjukkan adanya saponin.

Pemeriksaan triterpenoid dilakukan dengan cara : 1 gram serbuk dan fraksi ditambahkan 10 ml kloroform. Larutan diambil 5 ml dan kemudian diuapkan dalam cawan penguap. Selanjutnya ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard 2 tetes anhidrida asam asetat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna kecoklatan (Harborne 1987).

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara serbuk simplisia dan fraksi ditambah 10 ml air panas kemudian mendidikan selama 15 menit dan menyaringnya. Filtrat yang diperoleh disebut larutan B. Sebanyak 5 ml larutan B ditambah pereaksi besi (III) klorida 1%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan (Robinson 1995).

## **10. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji**

Bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 dalam biakan murni diambil 2 atau 3 ose steril kemudian dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril yang sudah berisi 5 ml BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, tingkat kekeruhan disetarakan dengan standar Mc Farland 0,5 setara dengan  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml dan selanjutnya digunakan untuk identifikasi. Tujuan disesuaikannya suspensi bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 dengan standar Mc Farland 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

## **11. Identifikasi Bakteri Uji**

**10.1. Identifikasi dengan cawan gores.** Biakan *S. dysenteriae* ATCC 9361 diinokulasi secara perataan pada media *Salmonella, Shigella Agar* (SSA),

diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. *S. dysenteriae* ATCC 9361 merupakan bakteri yang tidak dapat memfermentasi laktosa sehingga dalam media SSA tidak menimbulkan warna.

**10.2. Pewarnaan.** Identifikasi mikroskopis bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 dilakukan dengan cara pengecatan Gram. Pertama dibuat apusan diatas objek gelas, kemudian difiksasi. Selanjutnya ditetesi pewarna Gram A yang berisi kristal violet selama satu menit, lalu cuci lanjutkan ditetesi dengan pewarna Gram B yang berisi larutan lugol selama satu menit. Setelah itu dicuci kembali dan dilanjutkan dengan ditetesi pewarna Gram C sebagai peluntur selama 30 detik kemudian dicuci. Terakhir ditetesi dengan pewarna Gram D yang berisi safranin selama 1 menit kemudian dicuci dan dikering-anginkan, setelah kering diamati dengan mikroskop. Gram negatif *S. dysenteriae* ATCC 9361 memberikan hasil berwarna merah.

**10.3. Identifikasi dengan uji biokimia.** Medium yang digunakan yaitu SIM, KIA, LIA, dan Sitrat.

**10.3.1. Uji pada media SIM.** Bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 diinokulasi pada permukaan media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji adanya sulfid, indol dan motilitas. Uji sulfid positif apabila media berwarna hitam. Uji indol positif apabila media terbentuk warna merah setelah ditambahkan dengan reagen Erlich A dan Erlich B. Uji motilitas positif apabila terjadi pertumbuhan pada seluruh media.

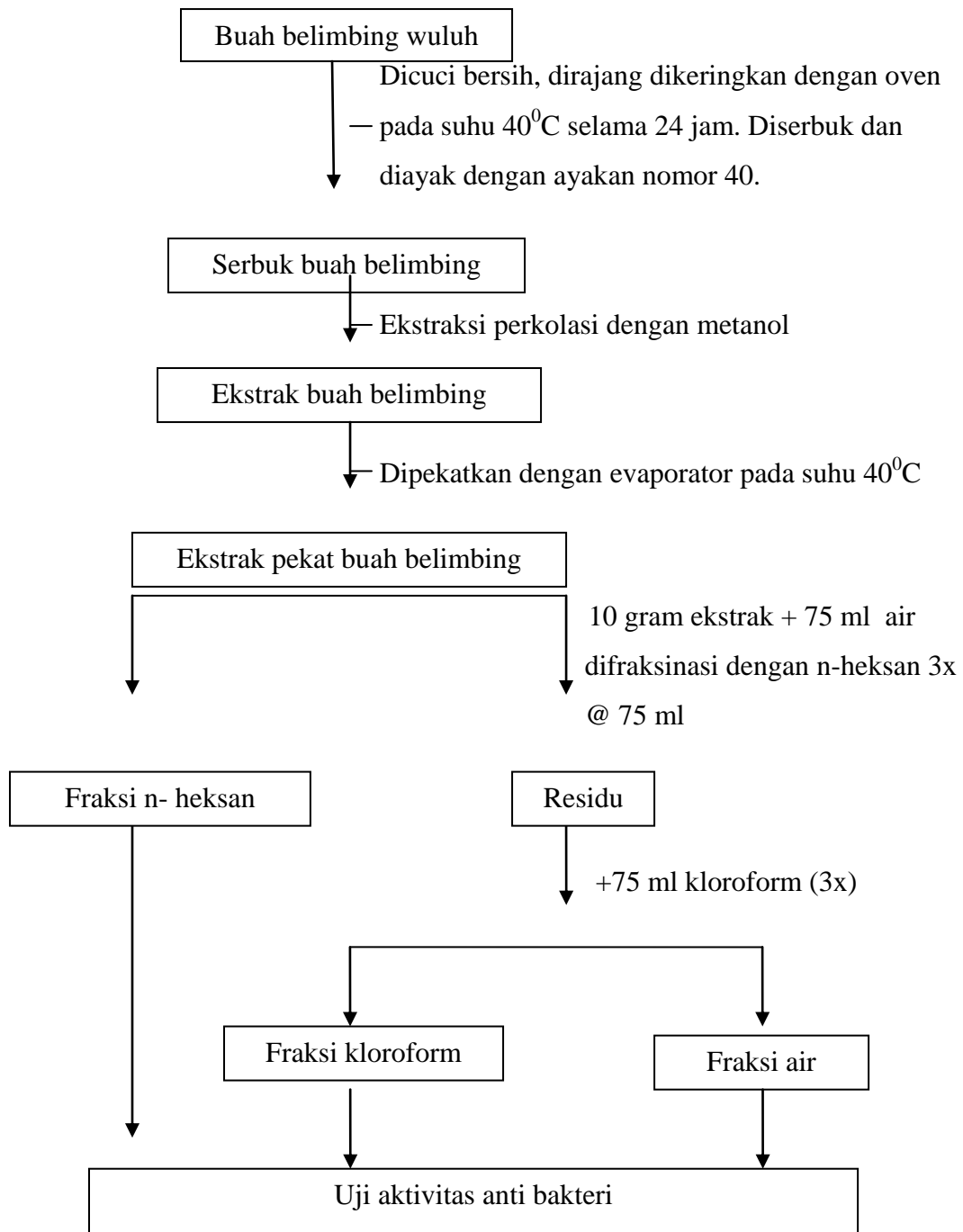
**10.3.2. Uji pada media KIA.** Bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 diinokulasi pada media dengan cara tusukan dan goresan, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar terdapat gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif apabila bagian lereng berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+) terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+).

**10.3.3. Uji pada media LIA.** Bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 diinokulasi dengan cara goresan. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi lysine dan menghasilkan H<sub>2</sub>S. Uji positif apabila menunjukkan hasil (K/AS<sup>-</sup>) artinya pada bagian lereng medium akan berwarna ungu menandakan tidak terjadinya proses deaminasi lisin, pada bagian dasar medium akan berwarna kuning menandakan tidak terjadinya proses dekarboksilasi tetapi terjadi proses fermentasi glukosa dan tidak membentuk warna hitam menandakan tidak terbentuknya sulfide.

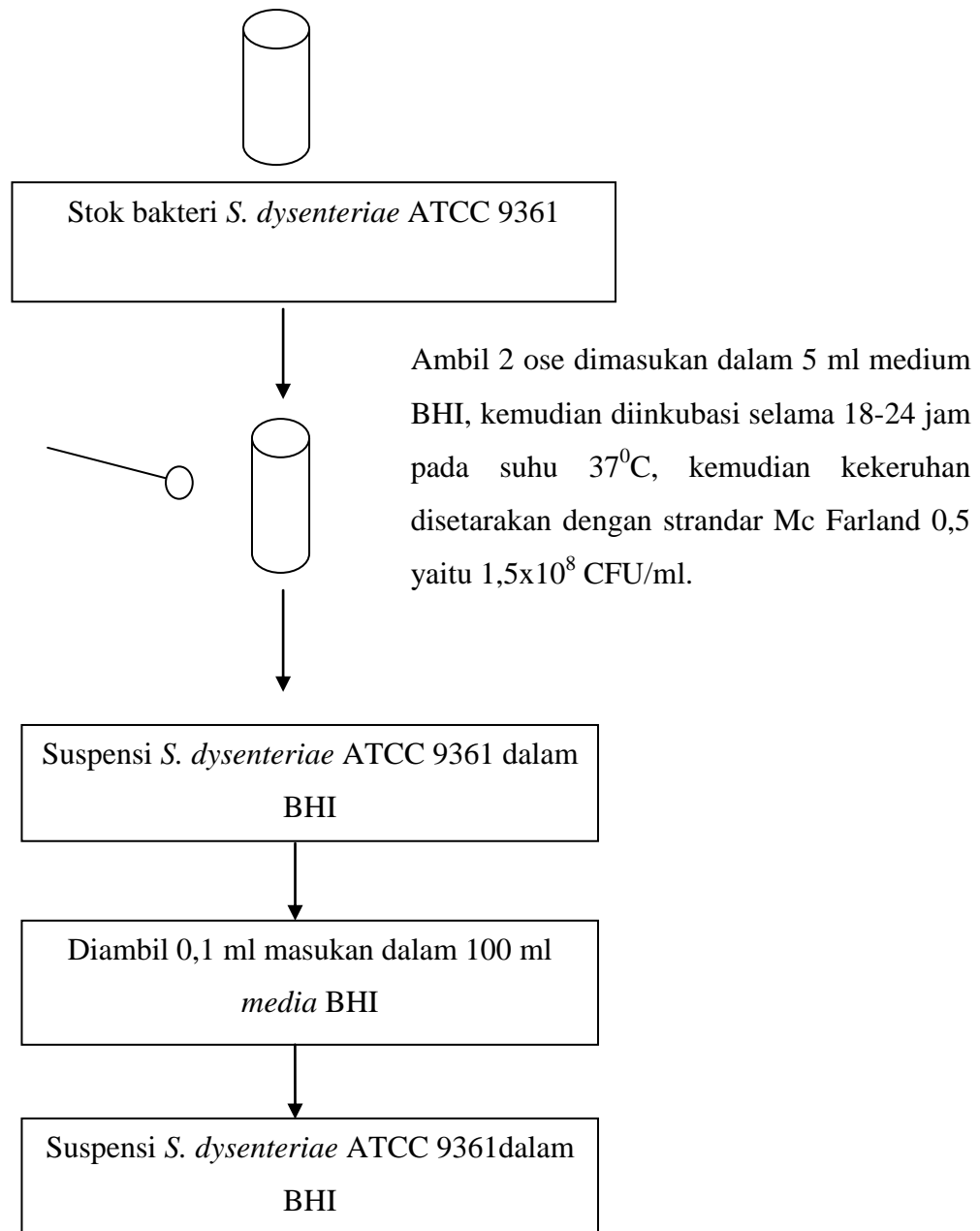
**10.3.4. Uji pada media Sitrat.** Bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 diinokulasi pada media SCA dengan cara digoreskan pada permukaan miring. Identifikasi bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri dapat menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif apabila medium berubah warna menjadi biru.

## **11. Pengujian Aktivitas Antibakteri**

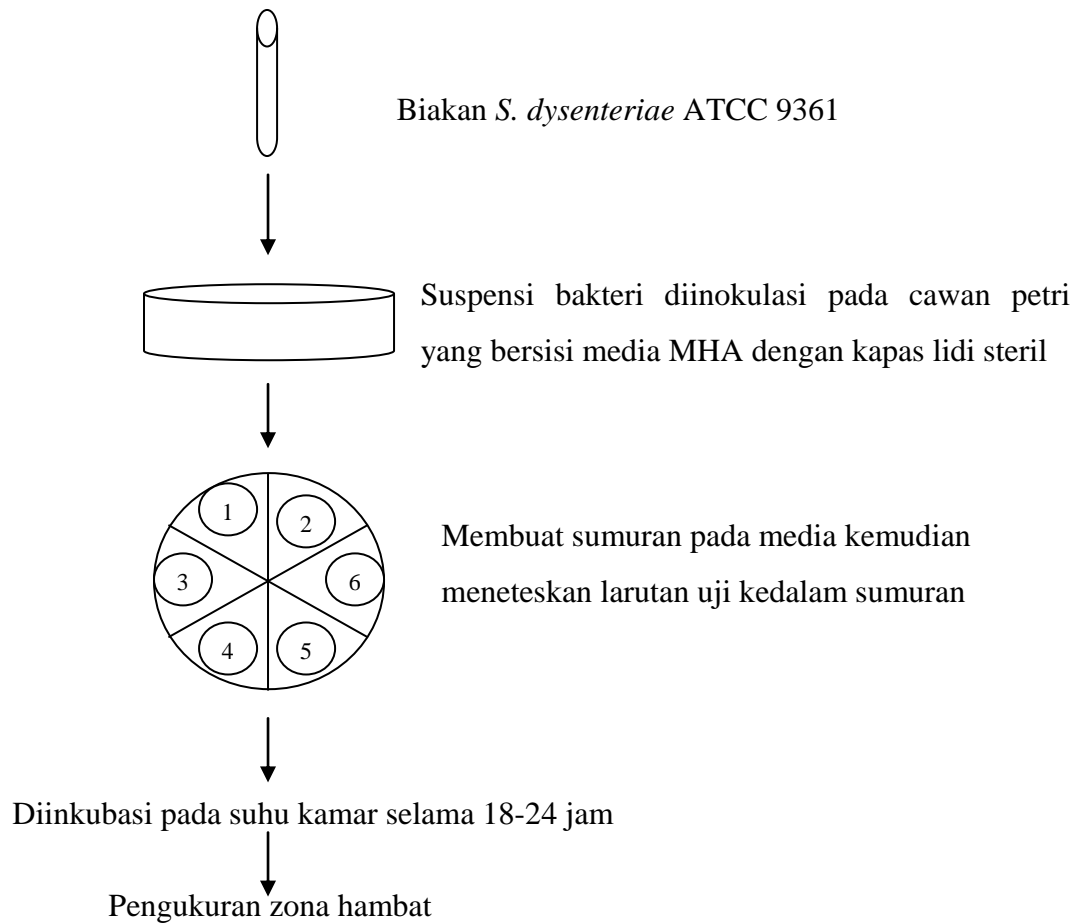
Hasil ekstrak metanolik, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi air buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) yang diperoleh diuji secara mikrobiologi dengan bakteri uji *S. dysenteriae* ATCC 9361. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi. Metode difusi yaitu dengan mengetahui hambatan pertumbuhan dari biakan bakteri uji. Metode ini dilakukan dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi yang telah dibuat dan ditekan-tekan pada ujung tabung, kemudian dioleskan pada media sampai rata, didiamkan selama 10-15 menit, dan dibuat beberapa sumuran. Dua sumuran untuk kontrol positif yaitu kotrimoksazol dan kontrol negatif yaitu DMSO 1%, sumuran yang lain diisi dengan fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi air dengan seri konsentrasi masing-masing 400 mg/ml; 200 mg/ml; 100 mg/ml; 50 mg/ml; 25 mg/ml. Biakan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37<sup>o</sup> C. Zonaambat pada daerah bening sumuran diukur diameternya.



**Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak dan fraksi.**



**Gambar 3. Skema pembuatan suspeksi bakteri dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5.**



**Gambar 4. Skema Pengujian Antibakteri Menggunakan Metode difusi.**

Keterangan :

- Sumuran 1 : Kontrol positif (kotrimoksazol 25 $\mu$ l)
- Sumuran 2 : Kontrol negatif (DMSO 1%)
- Sumuran 3-6 : Fraksi (400 mg/ml; 200 mg/ml; 100 mg/ml; 50 mg/ml;)

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil penelitian

##### 1. Hasil identifikasi tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Identifikasi tanaman belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) dilakukan di laboratorium Morfologi dan Sistematika Tumbuhan Universitas Setia Budi Surakarta. Hasil menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini benar berjenis belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.). Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang digunakan untuk penelitian dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman belimbing wuluh sesuai kepustakaan. Keterangan identifikasi tanaman yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 1.

##### 2. Hasil pembuatan serbuk buah belimbing wuluh

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) yang diambil secara acak dari beberapa pohon dipilih buah yang berwarna hijau, segar dan bebas dari penyakit yang diperoleh dari daerah Panjang Sari Baru, Kecamatan Parakan, Kabupaten Temanggung, Jawa Tengah pada bulan Juli 2017.

Buah belimbing wuluh dicuci bersih dengan air mengalir sampai terbebas dari debu dan kotoran, ditiriskan, dan dipotong tipis-tipis untuk mempermudah pengeringan, kemudian dioven pada suhu 40<sup>0</sup>C selama 7 hari, diblender, diayak dengan ayakan nomor 40. Tujuan proses pengeringan adalah untuk menurunkan kadar air yang terkandung dalam buah belimbing wuluh dan menghindari pertumbuhan bakteri dan jamur.

**Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah buah belimbing wuluh**

Berat basah (gram)	Berat kering (gram)	Rendement %
12000	1000	8,3

Berdasarkan tabel 1 di atas dapat dilihat bahwa persentase hasil pengeringan buah belimbing wuluh sebanyak 12000 gram bobot basah kemudian

dikeringkan dan didapat bobot kering 1000 gram sehingga diperoleh rendemen 8,3%.

**Tabel 2. Prosentase bobot serbuk halus terhadap bobot serbuk kasar belimbing wuluh**

Berat serbuk kasar (gram)	Berat serbuk halus (gram)	Rendemen simplisia (%b/b)
1000	900	90

Berdasarkan tabel 2, hasil penyerbukan buah belimbing wuluh dengan mesin grinder didapatkan serbuk kasar sebanyak 1000 gram kemudian diayak dengan pengayak nomor 40 didapatkan serbuk halus sebanyak 900 gram sehingga diketahui rendemen simplisia serbuk halus buah belimbing wuluh adalah sebesar 90%.

### 3. Penetapan susut pengeringan serbuk buah belimbing wuluh

Hasil penetapan susut pengeringan buah belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 3

**Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk buah belimbing wuluh**

Replikasi	Penimbangan (gram)	volume air (ml)	Kadar air (%)
1	20	1,2	6
2	20	1,8	9
3	20	1,7	8,5
Rata-rata			7,8%

Berdasarkan tabel 3, didapat rata-rata persentase susut pengeringan serbuk buah belimbing wuluh sebesar 7,8% dengan 3 kali replikasi menggunakan alat *Sterling-Bidwel*. Serbuk buah belimbing wuluh memenuhi syarat karena prosentase susut pengeringan serbuk buah belimbing wuluh kurang dari 10%. Kadar air yang tinggi dalam serbuk dapat mengakibatkan pertumbuhan jamur maupun bakteri dan mengaktifkan enzim-enzim dalam simplisia sehingga menurunkan mutu serbuk dan kualitas ekstrak.

### 4. Hasil pembuatan ekstrak metanol buah belimbing wuluh

Serbuk buah belimbing wuluh diekstraksi dengan menggunakan metode perkolasi. Pelarut yang digunakan adalah metanol, ekstrak cair dipekatkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

**Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak metanol buah belimbing wulu**

Bahan Sampel (gram)	Bobot Ekstrak (gram)	Rendemen ekstrak (%)
500	230	46

Berdasarkan tabel 4 di atas dapat dilihat bahwa perhitungan persentase rendemen hasil perkolasi serbuk buah belimbing wuluh sebanyak 500 gram yang dilarutkan dengan pelarut metanol didapat ekstrak kental seberat 230 gram sehingga diperoleh rendemen ekstrak sebesar 46%. Ekstrak kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut n-heksan, kloroform, dan air untuk memisahkan senyawa yang terkandung dalam buah belimbing wuluh berdasarkan kepolaran.

### 5. Hasil uji bebas metanol ekstrak buah belimbing wuluh



Uji bebas metanol dilakukan untuk memastikan bahwa ekstrak sudah terbebas dari metanol.

**Tabel 5. Hasil uji bebas metanol ekstrak buah belimbing wuluh**

Prosedur	Hasil	Pustaka
Ekstrak + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat + CH <sub>3</sub> COOH dipanaskan	Tidak tercium bau ester dari methanol	Tidak tercium bau ester dari metanol (Praeparandi 2006)

Hasil uji bebas metanol pada tabel 5 menunjukkan bahwa ekstrak buah belimbing wuluh terbebas dari pelarutnya yaitu metanol yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester. Uji bebas metanol bertujuan agar ekstrak tidak terdapat metanol yang memiliki aktivitas antibakteri sehingga tidak mengganggu aktivitas antibakteri dari ekstrak buah belimbing wuluh.

#### 6. Hasil fraksi ekstrak buah belimbing wuluh

Fraksinasi adalah sebuah metode pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan kandungan senyawa utama satu dengan kandungan senyawa utama yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran. Ekstrak kental difraksinasi secara berturut-turut menggunakan pelarut dengan polaritas yang berbeda. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok senyawa tersebut. Fraksinasi dilakukan dengan cara ditimbang 10 gram ekstrak metanol buah belimbing wuluh kemudian difraksinasi dengan 3 kali replikasi. Fraksinasi dilakukan dari pelarut yang bersifat nonpolar agar proses pengikatan senyawa bertahap dan seluruh senyawa tidak ditarik oleh pelarut polar yang bersifat menarik seluruh senyawa, sehingga penyarian dengan pelarut polar dilakukan paling akhir. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 12.

**Tabel 6. Hasil fraksinasi dari ekstrak metanol buah belimbing wuluh**

Nama pelarut	Replikasi	Rendemen (%b/b)
n-heksana	1	12,6
	2	19,3
	3	20,3
Rata-rata		17,4
Kloroform	1	25,5
	2	20,7
	3	23,0
Rata-rata		23,1
Air	1	56,0
	2	57,1
	3	52,1
Rata-rata		55,1

Berdasarkan tabel 6 di atas dapat dilihat bahwa hasil fraksinasi setiap pelarut berbeda dimana fraksi air lebih besar dibanding kloroform dan *n*-heksana, sedangkan fraksi kloroform lebih besar dari pada *n*-heksana. Air adalah pelarut yang bersifat polar sehingga dapat diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam buah belimbing wuluh lebih banyak mengandung senyawa yang bersifat polar. Hasil rendemen yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu 100% atau mendekati 100%, kemungkinan disebabkan ekstrak banyak yang menempel pada wadah dan corong pisah.

#### 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk, ekstrak dan fraksi buah belimbing wuluh

Uji kandungan senyawa kimia bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang terdapat di dalam serbuk, ekstrak, dan fraksi sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut. Pengujian dilakukan secara kualitatif dengan reaksi warna terhadap kandungan kimia flavonoid, saponin, triterpenoid, dan tanin, hasil positif akan memberikan tanda yang khas untuk setiap pengujian. Berikut ini adalah hasil dari pengujian kandungan senyawa kimia dari serbuk, ekstrak, dan fraksi buah belimbing wuluh.

**Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dari serbuk, ekstrak, dan fraksi buah belimbing wuluh**

Senyawa	Hasil	Serbuk	Ekstrak	<i>n</i> -heksana	Kloroform	Air
Flavonoid	Reaksi positif warna kuning/merah/jingga pada lapisan amil alkohol (Puspasari <i>et al</i> 2014).	+	+	-	+	+
Saponin	Reaksi positif bila penambahan HCl 2N 2 tetes busa tidak hilang (Puspasari <i>et al</i> 2014).	+	+	-	+	+
Triterpenoid	Merah kecoklatan atau ungu (Harborne 1987)	+	+	+	-	-
Tanin	Reaksi positif bila mengalami perubahan warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Alamsyah <i>et al</i> 2014)	+	+	-	+	+

Keterangan : + : ada senyawa  
- : tidak ada senyawa

Berdasarkan tabel 3 di atas, hasil identifikasi kandungan senyawa kimia di dalam serbuk dan ekstrak buah belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin, triterpenoid, dan tanin, pada fraksi *n*-heksana menunjukkan hasil positif mengandung saponin dan triterpenoid, pada fraksi kloroform menunjukkan hasil positif mengandung flavonoid, saponin, dan tanin, pada fraksi air menunjukkan hasil positif pada flavonoid, saponin, dan tanin.

## 8. Hasil identifikasi bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361

**8.1 Metode goresan.** Identifikasi *S. dysenteriae* ATCC 9361 dilakukan menggunakan media *Salmonella, Shigella Agar* (SSA). Bakteri diinokulasikan pada media SSA setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil goresan menunjukkan koloni kecil bundar transparan, cembung, tepi berbatas tegas, mencapai diameter sekitar 2 mm. Gambar hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 7.

**8.2 Metode mikroskopis dengan pewarnaan gram.** Hasil pengamatan *S. dysenteriae* ATCC 9361 dengan pewarnaan Gram pada perbesaran 100x akan tampak berwarna merah dan berbentuk batang, sehingga dapat disimpulkan bahwa bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 merupakan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif memiliki membran peptidoglikan yang lebih tipis dibandingkan dengan bakteri Gram positif, sehingga pada proses pengecatan bakteri Gram negatif tidak dapat mempertahankan warna kristal violet dari Gram A. Pada proses pengecatan menggunakan Gram D ( Safranin) zat warna akan terserap pada dinding selnya dan menyebabkan sel berwarna merah. Hasil gambar dapat dilihat di lampiran 7.

**8.3 Uji biokimia.** Uji biokimia bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 dilakukan dengan menggunakan media SIM, KIA, LIA, dan Citrat. Bakteri diinokulasi tabung reaksi berisi media SIM, KIA, LIA, dan Citrat diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil identifikasi uji biokimia *S. dysenteriae* ATCC 9361 dapat dilihat pada tabel 8.

**Tabel 8. Hasil identifikasi uji biokimia pada *S. dysenteriae* ATCC 9361**

Media	Identifikasi	Hasil	Pustaka (WHO 2003; Jawetz 2010)
SIM	Bakteri ditusukkan pada media	- - -	- + -
KIA	Bakteri ditusukkan dan digores pada media	K/A S <sup>-</sup>	K/A S <sup>-</sup>
LIA	Bakteri ditusukkan dan digores pada media	K/A S <sup>-</sup>	K/A S <sup>-</sup>
Citrat	Bakteri ditusukkan pada media	-	-

Keterangan :

SIM	= Sulfid Indol Motility
KIA	= Kliger Iron Agar
LIA	= Lysin Indol agar
Citrat	= Sommons Citrate Agar (SCA)
-	= Reaksi negative
+	= Reaksi positif
A	= Acid (asam)
K	= Alkali (basa)
S	= Sulfida

Identifikasi pada media SIM untuk mengetahui terbentuknya *sulfida*, *indol*, dan *motilitas*. Hasil identifikasi secara biokimia pada medium SIM menunjukkan hasil (- - -) yaitu sulfida negatif ditandai dengan tidak adanya warna hitam pada media karena bakteri tidak dapat memproduksi sodium thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfid. Indol negatif karena bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 tidak dapat menghasilkan enzim tryphanase yang mengubah tryptophan menjadi indol ditambah asam piruvat dan NH<sub>3</sub> dan motilitas negatif yang berarti tidak ada pergerakan bakteri

menyebarkan ke seluruh media, bakteri hanya tumbuh pada bekas tusukan, artinya bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 tidak memiliki alat gerak.

Hasil pengujian pada media KIA memberikan hasil bagian lereng berwarna merah (K) karena adanya proses dekarboksilasi oksidatif protein di bagian permukaan membentuk amina ( $\text{NH}_3$ ) yang bersifat alkali dengan adanya phenol red maka membentuk warna merah. Bagian dasar berwarna kuning (A), karena *S. dysenteriae* ATCC 9361 memfermentasi glukosa yang bersifat asam dan tidak memfermentasikan laktosa. Sulfida negatif ( $\text{S}^-$ ) ditandai dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media karena tidak memproduksi hidrogen sulfida.

Hasil pengujian pada media LIA menunjukkan bagian lereng berwarna ungu karena bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 mendekarboksilasi lisin sehingga menyebabkan reaksi basa, dasar berwarna kuning karena bakteri mendeaminasi lisin, sulfida negatif ( $\text{S}^-$ ) karena tidak terbentuk warna hitam pada media.

Hasil pengujian pada media citrat diperoleh hasil negatif (-) dengan ditandai media tetap berwarna hijau, artinya bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. *S. dysenteriae* ATCC 9361 menggunakan glukosa sebagai sumber karbon.

#### 9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri buah belimbing wuluh

Ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air buah belimbing wuluh dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *S. dysenteriae* ATCC 9361 menggunakan metode difusi dengan konsentrasi masing-masing 400 mg/ml; 200 mg/ml; 100 mg/ml; 50 mg/ml; 25 mg/ml, dan perbandingan kontrol positif kotrimoksazol, kontrol negatif DMSO 1%. Metode difusi digunakan untuk mengetahui fraksi yang paling efektif dilihat dari luas diameter zona hambatnya.

Daerah bening di sekitar sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air dari ekstrak metanol buah belimbing wuluh memiliki daya hambat terhadap *S. dysenteriae* ATCC 9361.

**Tabel 9. Hasil diameter hambat uji aktivitas antibakteri secara difusi**

Sediaan uji	Konsentrasi mg/ml	Diameter hambat			Rata-rata (mm) ± SD
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	400	20	19,5	20	19,8 ± 0,288
	200	17	17	18	17,3 ± 0,577
	100	13	12,5	12	12,5 ± 0,5
	50	8	7	7,5	7,5 ± 0,5
	25	0	0	0	0
Fraksi <i>n</i> -heksana	400	14,5	15	15,5	15 ± 0,5
	200	12	12,5	11	11,8 ± 0,763
	100	10	9	9	9,3 ± 0,577
	50	9	8	8	8,3 ± 0,577
	25	0	0	0	0
Fraksi kloroform	400	20	20	21	20,3 ± 0,577
	200	19	18	18	18,3 ± 0,577
	100	14	14	13	13,6 ± 0,577

	50	12	11,5	11	11,5 ± 0,5
	25	0	0	0	0
Fraksi air	400	18	18	17	17,6 ± 0,577
	200	17	16	17	16,6 ± 0,577
	100	14,5	14	12	13,5 ± 1,322
	50	11	12	11	11,3 ± 0,577
	25	0	0	0	0
Kontrol (+) kotrimoksazol	25 µg	23	22,5	23,5	23 ± 0,5
Kontrol (-) DMSO	1%	0	0	0	0

Berdasarkan tabel 9 di atas dapat dilihat bahwa pengujian aktivitas antibakteri ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air dari buah belimbing wuluh memiliki daya hambat terhadap bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361 dengan adanya zona bening. Fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air dari ekstrak metanol buah belimbing wuluh dengan konsentrasi yang berbeda menunjukkan adanya diameter hambat yang berbeda pula.

Kecilnya zona hambat yang dihasilkan pada penelitian ini disebabkan oleh suspensi bakteri yang digunakan tidak sesuai dengan standar Mc Farland 0,5. Jumlah bakteri yang terdapat dalam suspensi lebih dari  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml karena terjadinya kesalahan pada proses standarisasi suspensi, sehingga kinerja dari ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi air menjadi tidak maksimal.

Fraksi kloroform memiliki daya hambat paling besar dibandingkan dengan fraksi lainnya. Diameter zona hambat paling besar dari fraksi kloroform ditunjukkan pada konsentrasi 400 mg/ml dengan rata-rata diameter sebesar 20,3 mm, karena sifat kloroform yang semi polar sehingga menyebabkan fraksi mengandung metabolisme sekunder yang lebih kompleks dibandingkan pada fraksi polar dan non polar oleh sebab itu fraksi kloroform lebih banyak menarik senyawa antibakteri antara lain flavonoid, saponin, dan tanin.

Fraksi air yang bersifat polar juga dapat menarik senyawa flavonoid, saponin, dan tanin, namun diameter zona hambat yang dihasilkan tidak lebih besar jika dibandingkan dengan fraksi kloroform. Pada konsentrasi 400 mg/ml fraksi air memiliki rata-rata diameter zona hambat sebesar 17,6 mm. Hal ini kemungkinan disebabkan karena sifat air yang dapat melarutkan enzim-enzim yang terkandung di dalam tanaman sehingga mengakibatkan penurunan mutu senyawa aktif dan aktivitas antibakterinya menjadi kurang maksimal.

Fraksi *n*-heksana memiliki rata-rata diameter zona hambat paling kecil dibandingkan dengan fraksi kloroform dan air. Rata-rata zona hambat yang dihasilkan fraksi *n*-heksana pada konsentrasi 400 mg/ml adalah sebesar 15 mm, hal ini dikarenakan sifat *n*-heksana yang non polar sehingga hanya memiliki sedikit kandungan senyawa antibakteri.

Kontrol positif adalah suatu bahan kimia yang telah terbukti dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Kontrol positif yang digunakan adalah berupa cakram kotrimoksazol. Kotrimoksazol terbukti efektif dalam menghambat bakteri, hal ini ditunjukkan dengan diameter zona hambat yang paling besar dibandingkan dengan fraksi yang efektif.

Kontrol negatif adalah pelarut yang digunakan untuk melarutkan bahan uji dimana diketahui tidak memiliki aktivitas antibakteri. DMSO 1% digunakan untuk melarutkan ekstrak, fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air. DMSO 1% terbukti tidak dapat

menghambat pertumbuhan bakteri, ditunjukkan dengan tidak adanya zona hambat yang terbentuk.

Flavonoid, saponin dan tanin merupakan senyawa polar yang memiliki aktivitas antibakteri dengan merusak membran sitoplasma yang menyebabkan bocornya metabolit penting dan menginaktifkan sistem enzim bakteri (Ardananurdin *et al* 2004). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah dengan mengerutkan dinding sel bakteri sehingga dapat mengganggu permeabilitas sel. Terganggunya permeabilitas sel dapat menyebabkan sel tersebut tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat (Anggraini & Saputra 2016).

Tirterpenoid merupakan senyawa non polar yang bekerja sebagai antibakteri dengan merusak membran sel bakteri. Kerusakan membran sel dapat terjadi ketika senyawa aktif antibakteri bereaksi dengan sisi aktif dari membran atau dengan melarutkan konstituen lipid dan meningkatkan permeabilitasnya. Membran sel bakteri terdiri dari fosfolipid dan molekul protein. Akibat peningkatan permeabilitas, senyawa antibakteri dapat masuk ke dalam sel. Ketika di dalam sel, senyawa tersebut dapat melisis membran sel atau mengkoagulasi sitoplasma dari sel bakteri tersebut (Adewoye *et al.* 2010).

Berdasarkan hasil analisis statistik untuk mengetahui hubungan aktivitas antibakteri terhadap *S. dysenteriae* ATCC 9361 antara fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, fraksi air, ekstrak metanol buah belimbing wuluh, kontrol positif dan kontrol negatif. Analisa pertama pada tabel One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah data hasil penelitian yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak. Hasil uji One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test menunjukkan bahwa nilai signifikansinya sebesar 0,897 nilai tersebut lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan data daya hambat yang diperoleh terdistribusi secara normal. Untuk uji kesamaan varian dilakukan dengan uji test homogeneity of variances pada kolom *Levene Statistic* menunjukkan bahwa signifikansinya adalah 0,584. Nilai tersebut lebih besar dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa varian dari data di atas adalah sama atau homogen.

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan daya hambat yang signifikan dari data sampel, maka dilanjutkan dengan melakukan uji ANOVA satu jalan. Hasil analisis ANOVA satu jalan dilakukan dengan menggunakan *Post Hoc Test*. Nilai signifikansinya menunjukkan yaitu sebesar 0,000 dimana nilai ini lebih kecil dari 0,05 atau adanya tanda bintang(\*) pada kolom *Mean Difference*. Melihat banyaknya tanda bintang(\*) pada kolom *Mean Difference* dengan demikian dapat disimpulkan bahwa adanya perbedaan daya hambat yang nyata antara fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform, fraksi air, ekstrak metanol buah belimbing wuluh, kontrol positif dan kontrol negatif. Hasil dapat dilihat pada Lampiran 15.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, ekstrak, fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air dari buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. dysenteriae* ATCC 9361.

Kedua, fraksi kloroform dari ekstrak buah belimbing wuluh adalah fraksi yang mempunyai aktivitas paling efektif terhadap *S. dysenteriae* ATCC 9361.

#### **B. Saran**

Pertama, perlu dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap buah belimbing wuluh dengan menggunakan metode penyarian dan menggunakan pelarut yang berbeda.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang isolasi senyawa aktif dari fraksi kloroform ekstrak buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.).

## DAFTAR PUSTAKA

- Adewoye E. O., A. T. Salami, and V. O. Taiwo. 2010. Anti-pasmodial and toxicological effects of methanolic bark extract of *Chrysophyllum albidum* in albino mice. *Journal of Physiology and Pathophysiology Vol.1*
- Akhyar. 2010. Uji Daya Hambat dan Analisis KLT Bioautografi Ekstrak Akar dan Buah Bakau (*Rhizophora stylosa* Griff) terhadap *Vibrio harveyi* [Skripsi]. Makassar: Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.
- Anggraini N, Saputra O. 2016. Khasiat Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) terhadap Penyembuhan Acne Vulgaris., Jurnal Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung.
- Ardananurdin A, Winarsih S, Widayat M. (2004). Uji Efektifits Dekok Bunga Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) Sebagai Antimikroba Terhadap Bakteri *Salmonella Typhi* Secara In Vitro. Jurnal Kedokteran Brawijaya, 20(1), 30-34.
- Budimulya U, Sunoto, Tjokronegoro A. 1983. *Penyakit Jamur Klinis, Epidemiologi, Diagnosis dan Terapi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- [Depkes RI]. 1979. *Farmakope Indonesia*. Edisi 3. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- [Depkes RI]. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 2-9, 51-56.
- [Depkes RI]. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi 4. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- [Depkes RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawas Obat Dan Makanan-Direktorat Pengawas Obat Tradisional.
- Das SC, Sultana S, Roy S, Hasan SS. 2011. *Antibacterial and Cytotoxic Activities of Methanolic Extracts of Leaf and Fruit Parts of the Plant Averrhoa bilimbi (Oxalidaceae)*. Bangladesh: *Journal university of Dhaka*. Department Teknologi Parmasetikal.
- Dasuki U. 1991. *Sistematika Tumbuhan Tinggi*. Bandung: Pusat Universitas Ilmu Hayati ITB.
- Dwi RH. Eektivitas Ekstrak Etanol Rimpang Kencur (*Kaempferia galangal* Linn.) Dalam Menghambat Pertumbuhan *Candida albicans* Isolate 218-SV Secara *in vitro* [Skripsi]. Malang: Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.



- Eka F, Alwi M, Umrah. 2013. Studi Efektivitas Daun Sereh Wangi (*Cymbopogon nardus* L.) sebagai Antifungi *Candida albicans*. *Biocelebes* 7: 15-20.
- Fardiaz S. 1992. *Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Ganiswara SG. 1995. *Farmakologi Dan Terapi*. Edisi IV, Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Gunawan D dan Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam Farmakognosi*. Jilid I. Cetakan I. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Harapan. 2015 : <http://tanaman--herbal.blogspot.co.id/2015/03/manfaat-dan-khasiat-belimbing-wuluh.html>. Diakses [22 Jan 2018].
- Harbone JB. 1987. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Moderen Menganalisis Tumbuhan*. Penerjemah; Patmawinata K, Soediro I, Bandung: Penerbit ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.
- Hariana A. 2005. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, edisi XXII. Jakarta: Penerbit Salemba Medika.
- Jawetz E, Melnick, JL Adelberg EA. 2007. *Medical Microbiology*. 23 th Ed. Penerjemah; Elferia NR, Jakarta. Hal 635-658, 665-667.
- Juliantina F, Dewa ACM, Bungan N, Titis N, Endrawati TB. 2008. Manfaat Sirih Merah (*piper crocatum*) Sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 60;58-62.
- Kandar A. 2010. Belimbing Sebagai Tanaman Obat. <http://www.belimbing.com>. Diakses [28 Nov 2017].
- Kurniawan D. 2015. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap *Candida albicans* Secara *in vitro* [Skripsi]. Pontianak: Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura.
- Kusumaningtyas E, Widiato RR, Gholib D. Uji Daya Hambat Ekstrak & Krim Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle*) Terhadap *Candida albicans* & *Trichophyton mentagriphytes*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan & Veteriner.
- Latifah QA. 2008. Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri Pada Buah Belimbing Wuluh (*Averhoa bilimbi L*) Dengan Variasi Pelarut. [Skripsi]. Malang: Fakultas Sains Dan Teknologi, Universitas Islam Negeri.

- Mukhlisoh W. 2010. Pengaruh Ekstrak Tunggal Dan Gabungan Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) Terhadap Efektivitas Antibakteri Secara *in vitro*. [Skripsi]. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Nafianti S, Sinuhaji AB. 2005. Resistensi Trimetropim-Sulfametoksazol terhadap *Shigellosis*. *Sari Pediatri* 7:39-44.
- Pelczar MJ, Chan EGS. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Hadioentomo RS, Imas T, Tjitrosomo S, Angka SL, penerjemah; Jakarta: Universitas Indonesia, 107-17.
- Permatawati HT. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak, Fraksi *n*-Heksan, Etil Asetat, dan Air dari Kulit Buah Kenitu (*chrysophyllum cainito*) Terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Stia Budi
- Praeparandi. 2006. *Card System Analisa Kimia Farmasi Kualitatif*. Bandung: Seksi Diktat Stenhl.
- Prihatini ND. 2015. Uji Aktivitas Antijamur Fraksi *n*-heksan, Etil Asetat Dan Air Dari Ekstrak Etanol Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamicensis* (L) *vahl*) Terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 Secara *in vitro* [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Ssetia Budi.
- Rahmiati A, Darmawati S, Mukaromah AH. 2017. Daya Hambat Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* Secara *In vitro*. *Prosiding Seminar Nasional*; Semarang, 30 September 2017. Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang. hlm 669-674.
- Sari M, Suryani C. 2014. Pengaruh Ekstrak Daun Belimbing Wuluh Dalam Menghambat Pertumbuhan Jamur *Candida albicans* Secara *in vitro*. Di dalam: Sari M, editor. *The Effect of Leaf Extract Starfruits (Averrhoa bilimbi L) in Inhibitor the Growth of Fungus Candida albicans with In Vitro*. *Prosiding Seminar Nasional Biologi dan Pembelajarannya*; Medan, 23 Agustus 2014. Universitas Negeri Medan. Hlm 325-332.
- Siregar. 2004. *Penyakit Jamur Kulit*. edisi 2. Jakarta: EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Susanti AD, Ardiana D, Gumelar GP, Bening YG. 2012. Polarits Pelarut Sebagai Pertimbangan dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza sativa galatinosa*). Surakarta: *Simposium Nasional RAPI XI FT UMS*.
- Voigt R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi 5<sup>th</sup>. Neononos, Penerjemah; Yogyakarta : Gajah Mada University Press.

- Widiyati E. 2006. Penentuan Adanya Senyawa Triterpenoid dan Uji Aktivitas Biologis pada Beberapa Spesies Tanaman Obat Tradisional Masyarakat Pedesaan Bengkulu. *Jurnal Gradien* 2:116-122.
- Yatim F. 2001. *Macam-Macam Penyakit Menular dan Pencegahannya*. Jakarta: Pustaka Populer Obor. hlm 39-41.
- Yuliana MN. 2014. Uji Aktivitas Teh Celup Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) Terhadap Penurunan Berat Badan Dan Penurunan Lemak Abdominal Pada Tikus Putih Betina (*Rattus norvegicus*) [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.

L

A

M

P

I

R

A

N

## Lampiran 1. Surat keterangan determinasi tanaman belimbing wuluh



### UPT- LABORATORIUM

No : 199/DET/UPT-LAB/27/VII/2017

Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Shinta Ramadhani

NIM : 17113264 A

Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Belimbing wuluh** (*Averrhoa bilimbi* L.)

Hasil determinasi berdasarkan : Steenis : FLORA

1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9b – 10b – 11b – 12b – 13b – 15b. golongan 9. 197b – 208b – 219b – 220b – 224b – 225b – 227b – 229b – 230b – 234b – 235b – 236b – 237b – 238a. familia 61. Oxalidaceae. 1a. Averrhoa. *Averrhoa bilimbi* L.

Deskripsi :

Habitus : Pohon, 5 – 10 meter.

Batang : Bulat, berkayu, monopodial, tegak. Tanda bekas daun bentuk ginjal atau jantung.

Daun : Daun majemuk menyirip ganjil. Daun penumpu tidak ada. Anak daun memanjang, meruncing, pangkal membulat, tepi rata, panjang 5,5 – 8,5 cm, lebar 1,7 – 2 cm, ke arah ujung poros lebih besar, permukaan bawah hijau muda.

Bunga : Bunga dalam ketiak daun yang masih ada atau yang sudah rontok atau pada kayu tua, beraturan, berkelamin 2. Majemuk, malai menggantung, keluar dari batang atau cabang yang besar. Bunga semuanya dengan panjang tangkai putik yang sama. Daun kelopak 5, tetap, panjang lk 6 mm. Daun mahkota 5, terputir waktu dalam kuncup, rontok, tidak atau hampir bergandengan, bentuk spatel atau lanset, dengan pangkal yang pucat. 5 benang sari di depan daun mahkota mereduksi menjadi staminodia, kepala sari beruang 2. Bakal buah menumpang.

**Buah : Buni bulat persegi membulat tumpul, kuning hijau, panjang 4-6,5 cm, mengandung banyak air, terasa sangat masam.**

Akar : Tunggang.

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

Surakarta, 27 Juli 2017

Um determinasi

Dra Kartunah Wirjosoendjojo, SU.

**Lampiran 2. Gambar buah belimbing wuluh dan serbuk buah belimbing wuluh**



**Buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)**



**Serbuk buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)**

**Lampiran 3. Foto fraksinasi****Foto fraksinasi**

**Lampiran 4. Foto evaporator dan oven****Vaccum rotary****Oven**



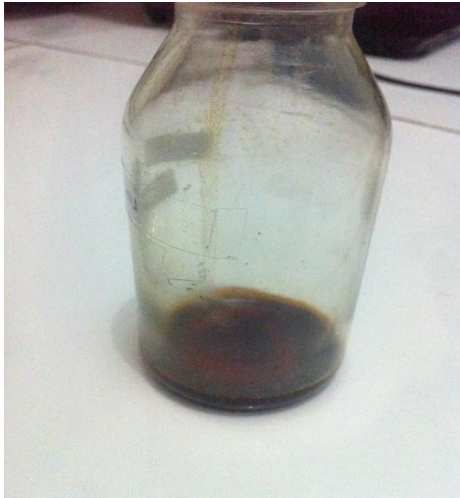
**Lampiran 5. Hasil ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air**



**Ekstrak metanol**



**fraksi *n*-heksana**







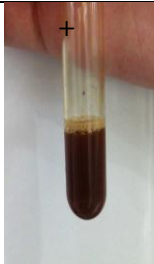



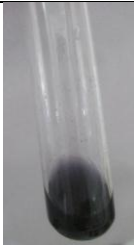











**Fraksi kloroform**



**fraksi air**

Lampiran 6. Foto hasil identifikasi senyawa kimia

Senyawa	Bahan uji				
	serbuk	Ekstrak	<i>n</i> -heksana	Kloroform	Air
FLAVONOID	 +	 +	 -	 +	 +
SAPONIN	 +	 +	 -	 +	 +
TANIN	 +	 +	 -	 +	 +
TRITERPENOID	 +	 +	 +	 -	 -

Lampiran 7. Hasil identifikasi *S. dysenteriae* ATCC 9361

Koloni *S. dysenteriae* ATCC  
9361



Koloni *S. dysenteriae* ATCC 9361

**Identifikasi cawan gores pada media SSA**



Bakteri *S. dysenteriae* ATCC 9361

**Pewarnaan gram**



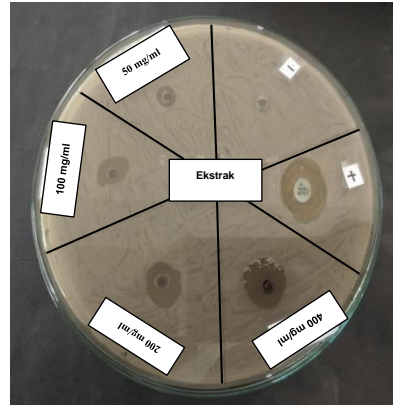
#### Hasil identifikasi uji biokimia pada *S. dysenteriae* ATCC 9361

Media	Identifikasi	Hasil	Pustaka (WHO 2003; Jawetz 2010)
SIM	Bakteri ditusukkan pada media	- - -	- + -
KIA	Bakteri ditusukkan dan digores pada media	K/A S <sup>-</sup>	K/A S <sup>-</sup>
LIA	Bakteri ditusukkan dan digores pada media	K/A S <sup>-</sup>	K/A S <sup>-</sup>
Citrat	Bakteri ditusukkan pada media	-	-

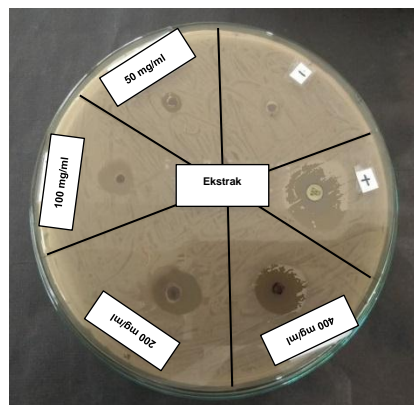
#### Keterangan :

SIM	= Sulfid Indol Motility
KIA	= Kligler Iron Agar
LIA	= Lysin Indol agar
Citrat	= Sommons Citrate Agar (SCA)
-	= Reaksi negative
+	= Reaksi positif
A	= Acid (asam)
K	= Alkali (basa)
S	= Sulfida

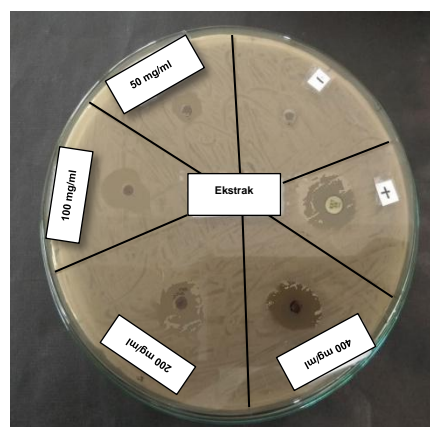
Lampiran 8. Gambar hasil difusi ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air terhadap *S. dysenteriae* ATCC 9361



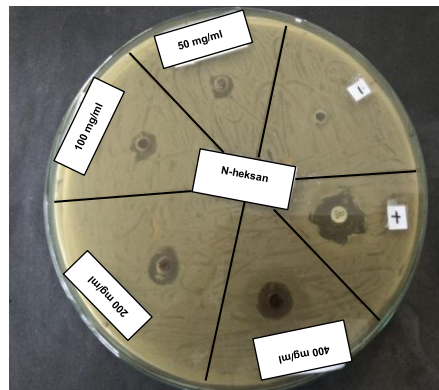
Ekstrak metanol replikasi I



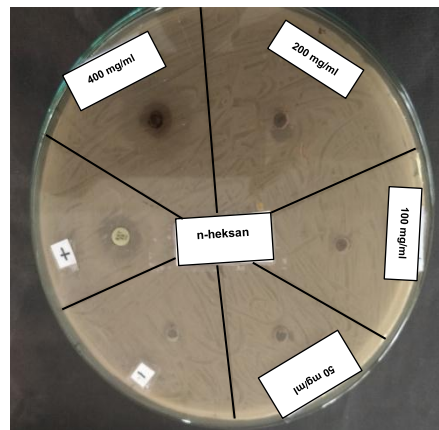
Ekstrak metanol replikasi II



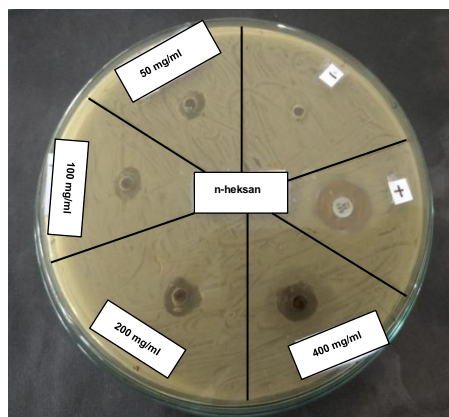
Ekstrak metanol replikasi III



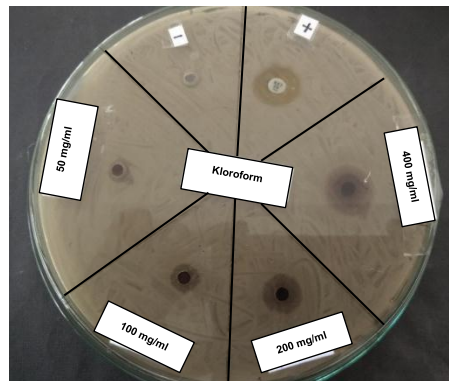
**Fraksi *n*-heksana replikasi I**



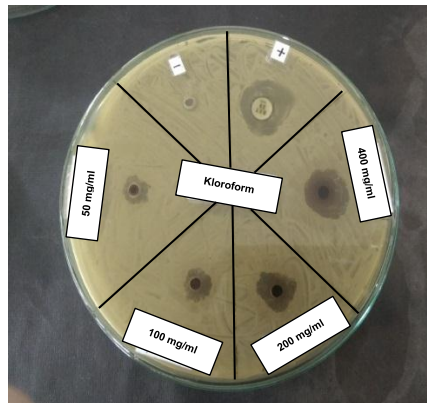
**Fraksi *n*-heksana replikasi II**



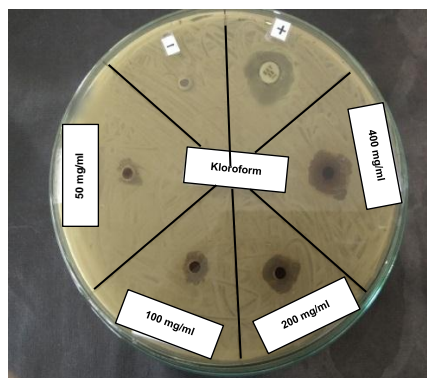
**Fraksi *n*-heksana replikasi III**



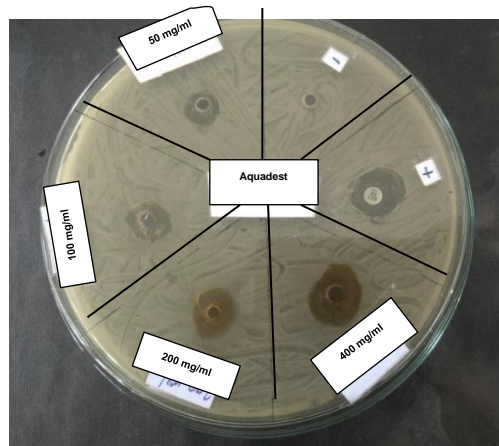
**Fraksi kloroform replikasi I**



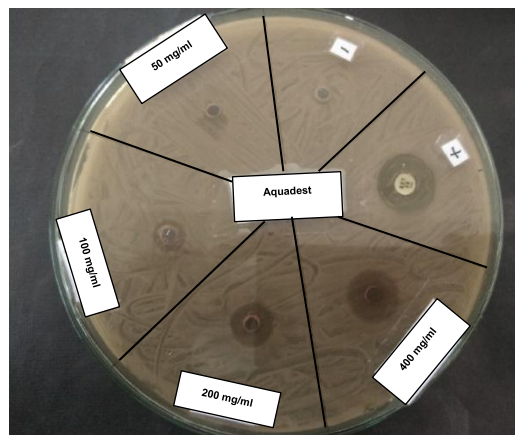
**Fraksi kloroform replikasi II**



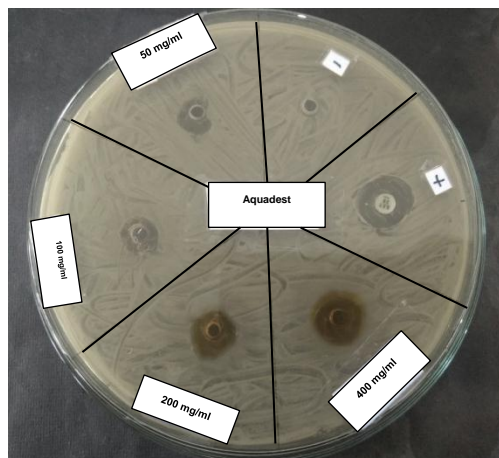
**Fraksi kloroform replikasi III**



**Fraksi Air replikasi I**



**Fraksi air replikasi II**



**Fraksi air replikasi III**



**Lampiran 9. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah buah belimbing wuluh**

Berat basah (gram)	berat kering (gram)	Rendemet %
12000	1000	8,3

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

$$= \frac{1000 \text{ gram}}{12000 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 8,3 \%$$

**Lampiran 10. Perhitungan susut pengeringan serbuk buah belimbing wuluh**

Replikasi	Penimbangan (gram)	volume air (ml)	Kadar air (%)
1	20	1,2	6
2	20	1,8	9
3	20	1,7	8,5
Rata-rata			7,8%

Keterangan :

1.  $\frac{1,2 \text{ ml}}{20 \text{ gram}} \times 100\% = 6\%$
2.  $\frac{1,8 \text{ ml}}{20 \text{ gram}} \times 100\% = 9\%$
3.  $\frac{1,7 \text{ ml}}{20 \text{ gram}} \times 100\% = 8,5\%$

Jadi, rata-rata kadar air dalam serbuk buah belimbing wuluh adalah 7,8%

**Lampiran 11. Perhitungan persentase rendemen hasil ekstrak metanol buah belimbing wuluh**

**Rendemen ekstrak metanol buah belimbing wuluh**

Bahan Sampel (gram)	Bobot Ekstrak (gram)	Rendemen ekstrak (%)
500	230	46

Perhitungan rendemen ekstrak metanol

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

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{230 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 46 \%$$

**Lampiran 12. Perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana, kloroform, dan air dari ekstrak buah belimbing wuluh**

Nama pelarut	Replikasi	Berat wadah + ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Berat wadah kosong (gram)	Rendemen (%b/b)
n-heksana	1	100,50	1,27	99,23	12,6
	2	89,05	1,94	87,11	19,3
	3	90,45	2,04	88,45	20,3
Rata-rata					17,4
Kloroform	1	87,60	2,57	85,03	25,5
	2	90,78	2,08	88,7	20,7
	3	92,38	2,31	90,07	23,0
Rata-rata					23,1
Air	1	216,50	5,64	210,86	56,0
	2	190,25	5,72	184,53	57,1
	3	189,27	5,20	184,07	52,1
Rata-rata					55,1

Perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana dari ekstrak emtanol buah belimbing wuluh

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{bobot fraksi}}{\text{boboy ekstrak}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{1,27}{10,06} \times 100 \% = 12,6\%$$

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{1,94}{10,024} \times 100 \% = 19,3 \%$$

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{2,00}{10,022} \times 100\% = 20,3 \%$$

### **lampiran 13. Pembuatan larutan dengan berbagai konsentrasi**

Pembuatan konsentrasi 400 mg/ml

Menimbang 0,4 gram ekstrak dan fraksi kemudian dimasukkan ke dalam vial ad 1 ml DMSO 1 %.

$$\text{Perhitungan } \frac{0,4 \text{ gram}}{1 \text{ ml}} = 0,4 \text{ gram/ml}$$

No	Konsentrasi (mg/ml)	V1	N1	V2	N2	Keterangan
1	400	-	-	-	-	1 ml larutan stok
2	400	-	-	-	-	0,5 ml larutan stok
3	200	0,5	400	1	200	0,5 ml lar. Stok + DMSO 1% ad 1 ml
4	100	0,5	200	1	100	0,5 ml tabung 3 + DMSO 1% ad 1 ml
5	50	0,5	100	1	50	0,5 ml tabung 4 + DMSO 1% ad 1 ml
6	25	0,5	50	1	25	0,5 ml tabung 5 + DMSO 1% ad 1 ml
7	12,5	0,5	25	1	12,5	0,5 ml tabung 6 + DMSO 1% ad 1 ml
8	6,25	0,5	12,5	1	6,25	0,5 ml tabung 7 + DMSO 1 % ad 1 ml
9	3,125	0,5	6,25	1	3,125	0,5 ml tabung 8 + DMSO 1% ad 1 ml
10	1,5625	0,5	3,125	1	1,5625	0,5 ml tabung 9 + DMSO 1% ad 1 ml
11	0,781	0,5	1,5625	1	0,781	0,5 ml tabung 10 + DMSO 1% ad 1 ml

Keterangan :

Tabung 2 : 0,5 ml ekstrak konsentrasi 400 mg/ml

Tabung 3 : konsentrasi 200 mg/ml

$$V1 \cdot N1 = V2 \cdot N2$$

$$V1 \cdot 400 \text{ mg/ml} = 1 \cdot 200 \text{ mg/ml}$$

$$V1 = \frac{200 \text{ mg/ml}}{400 \text{ mg/ml}}$$

$$V1 = 0,5$$

Dipipet 0,5 ml dari larutan stok (400 mg/ml) kemudian ditambahkan DMSO 1% sampai 1 ml

Tabung 11 dengan konsentrasi 0,781 mg/ml dipipet 0,5 ml dari tabung 10 ditambah DMSO 1% sampai dengan 1 ml, lalu dihomogenkan dan dibuang 0,5 ml.

## Lampiran 14. Formulasi dan pembuatan media

### 1. Formulasi dan pembuatan *Salmonella Shigella Agar* (SSA)

Beef extract.....	0,5	gram
Enzymatic Digest of Casein.....	2,5	gram
Enzymatic Digest of Animal Tissue.....	2,5	gram
Lactose.....	10,0	gram
Bile salts .....	8,5	gram
Sodium citrate.....	8,5	gram
Sodium thiosulfate .....	8,5	gram
Ferric citrate.....	1	gram
Brilliant green .....	0,00033	gram
Neutral red .....	0,025	gram
Agar .....	13,5	gram

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, tidak perlu disterilkan dengan otoklaf.

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

Brain infusion .....	12,5	gram
Heart infusion .....	5,0	gram
Proteose pepton.....	10,0	gram
Glucose .....	2,0	gram
Sodium Chloride.....	5,0	gram
di-sodium hydrogen phosphate .....	2,5	gram

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung pH 7,4.

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

Meat infusion.....	2,0	gram
Bacto asam kasamino.....	17,5	gram
Kanji .....	1,5	gram
Agar .....	17,0	gram

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.

### 4. Formulasi dan pembuatan *Sulfid indol Agar* (SIM)

Peptone from casein.....	20,0	gram
Peptone from meat .....	6,6	gram
Ammonium iron (II) citrate.....	0,2	gram
Sodium thiosulfate .....	3,0	gram

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

### 5. Formulasi dan pembuatan *Lysin Iron Agar* (LIA)

Peptone from meat .....	5,0	gram
-------------------------	-----	------

Yeast extract .....	3,0	gram
D(+)-glucose .....	1,0	gram
L-lysine monohydrochloride.....	10,0	gram
Sodium thiosulfate .....	0,04	gram
Ammonium iron (II) citrate.....	0,5	gram
Bromocresol purple.....	0,02	gram
Agar .....	12,5	gram

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

#### 6. Formulasi dan pembuatan citrat agar

Ammonium hidrogen fosfat .....	1	gram
Dipotassium hidrogen fosfat .....	1	gram
Sodium chloride.....	5	gram
Sodium citrate.....	2	gram
Mg sulfate .....	0,2	gram
Bromo thymol blue .....	0,08	gram
Agar .....	12,5	gram

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

#### 7. Formulasi dan pembuatan *Klinger Iron Agar* (KIA)

Peptone from casein.....	15,0	gram
Peptone from meat .....	5,0	gram
Meat extract .....	3,0	gram
Yeast extract .....	3,0	gram
Sodium chloride.....	5,0	gram
Lactose.....	10,0	gram
D(+)-glucose .....	1,0	gram
Ammonium iron (II) citrate.....	0,5	gram
Sodium thiosulfate .....	0,5	gram
Phenol red.....	0,024	gram
Agar .....	12,0	gram

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.

### Lampiran 15. Hasil analisis dengan SPSS

#### Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
diameter	54	13.7593	5.43984	.00	23.50

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		diameter
N		54
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	13.7593
	Std. Deviation	5.43984
Most Extreme Differences	Absolute	.095
	Positive	.095
	Negative	-.089
Kolmogorov-Smirnov Z		.594
Asymp. Sig. (2-tailed)		.897

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

#### Test of Homogeneity of Variances

diameter

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.722	17	36	.584

#### ANOVA

diameter

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1555.037	17	91.473	246.976	.000
Within Groups	13.333	36	.370		
Total	1568.370	53			



### Multiple Comparisons

Dependent Variable: diameter

LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak 400	ekstrak 200	2.50000*	.49690	.000	1.4922	3.5078
	ekstrak 100	7.33333*	.49690	.000	6.3256	8.3411
	ekstrak 50	12.33333*	.49690	.000	11.3256	13.3411
	Fraksi n-heksana 400	4.83333*	.49690	.000	3.8256	5.8411
	Fraksi n-heksana 200	8.00000*	.49690	.000	6.9922	9.0078
	Fraksi n-heksana 100	10.50000*	.49690	.000	9.4922	11.5078
	Fraksi n-heksana 50	11.50000*	.49690	.000	10.4922	12.5078
	Fraksi kloroform 400	-.50000	.49690	.321	-1.5078	.5078
	Fraksi kloroform 200	1.50000*	.49690	.005	.4922	2.5078
	Fraksi kloroform 100	6.16667*	.49690	.000	5.1589	7.1744
	Fraksi kloroform 50	8.33333*	.49690	.000	7.3256	9.3411
	Fraksi air 400	2.16667*	.49690	.000	1.1589	3.1744
	Fraksi air 200	3.16667*	.49690	.000	2.1589	4.1744
	Fraksi air 100	6.33333*	.49690	.000	5.3256	7.3411
	Fraksi air 50	8.50000*	.49690	.000	7.4922	9.5078
kotrimoksazol		-3.16667*	.49690	.000	-4.1744	-2.1589
	DMSO 1%	19.83333*	.49690	.000	18.8256	20.8411
ekstrak 200	ekstrak 400	-2.50000*	.49690	.000	-3.5078	-1.4922
	ekstrak 100	4.83333*	.49690	.000	3.8256	5.8411
	ekstrak 50	9.83333*	.49690	.000	8.8256	10.8411
	Fraksi n-heksana 400	2.33333*	.49690	.000	1.3256	3.3411
	Fraksi n-heksana 200	5.50000*	.49690	.000	4.4922	6.5078
	Fraksi n-heksana 100	8.00000*	.49690	.000	6.9922	9.0078
	Fraksi n-heksana 50	9.00000*	.49690	.000	7.9922	10.0078
	Fraksi kloroform 400	-3.00000*	.49690	.000	-4.0078	-1.9922
	Fraksi kloroform 200	-1.00000	.49690	.052	-2.0078	.0078
	Fraksi kloroform 100	3.66667*	.49690	.000	2.6589	4.6744
	Fraksi kloroform 50	5.83333*	.49690	.000	4.8256	6.8411
	Fraksi air 400	-.33333	.49690	.507	-1.3411	.6744
	Fraksi air 200	.66667	.49690	.188	-.3411	1.6744
	Fraksi air 100	3.83333*	.49690	.000	2.8256	4.8411

	Fraksi air 50	6.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	4.9922	7.0078
	kotrimoksazol	-5.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-6.6744	-4.6589
	DMSO 1%	17.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	16.3256	18.3411
ekstrak 100	ekstrak 400	-7.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-8.3411	-6.3256
	ekstrak 200	-4.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-5.8411	-3.8256
	ekstrak 50	5.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	3.9922	6.0078
	Fraksi n-heksana 400	-2.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-3.5078	-1.4922
	Fraksi n-heksana 200	.66667	.49690	.188	-.3411	1.6744
	Fraksi n-heksana 100	3.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	2.1589	4.1744
	Fraksi n-heksana 50	4.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	3.1589	5.1744
	Fraksi kloroform 400	-7.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-8.8411	-6.8256
	Fraksi kloroform 200	-5.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-6.8411	-4.8256
	Fraksi kloroform 100	-1.16667 <sup>*</sup>	.49690	.024	-2.1744	-.1589
	Fraksi kloroform 50	1.00000	.49690	.052	-.0078	2.0078
	Fraksi air 400	-5.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-6.1744	-4.1589
	Fraksi air 200	-4.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-5.1744	-3.1589
	Fraksi air 100	-1.00000	.49690	.052	-2.0078	.0078
	Fraksi air 50	1.16667 <sup>*</sup>	.49690	.024	.1589	2.1744
	kotrimoksazol	-10.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-11.5078	-9.4922
	DMSO 1%	12.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	11.4922	13.5078
ekstrak 50	ekstrak 400	-12.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-13.3411	-11.3256
	ekstrak 200	-9.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-10.8411	-8.8256
	ekstrak 100	-5.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-6.0078	-3.9922
	Fraksi n-heksana 400	-7.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-8.5078	-6.4922
	Fraksi n-heksana 200	-4.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-5.3411	-3.3256
	Fraksi n-heksana 100	-1.83333 <sup>*</sup>	.49690	.001	-2.8411	-.8256
	Fraksi n-heksana 50	-.83333	.49690	.102	-1.8411	.1744
	Fraksi kloroform 400	-12.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-13.8411	-11.8256
	Fraksi kloroform 200	-10.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-11.8411	-9.8256
	Fraksi kloroform 100	-6.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-7.1744	-5.1589
	Fraksi kloroform 50	-4.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-5.0078	-2.9922
	Fraksi air 400	-10.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-11.1744	-9.1589
	Fraksi air 200	-9.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-10.1744	-8.1589
	Fraksi air 100	-6.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-7.0078	-4.9922
	Fraksi air 50	-3.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-4.8411	-2.8256
	kotrimoksazol	-15.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-16.5078	-14.4922
	DMSO 1%	7.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	6.4922	8.5078

Fraksi n-heksana 400	ekstrak 400	-4.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-5.8411	-3.8256
	ekstrak 200	-2.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-3.3411	-1.3256
	ekstrak 100	2.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	1.4922	3.5078
	ekstrak 50	7.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	6.4922	8.5078
	Fraksi n-heksana 200	3.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	2.1589	4.1744
	Fraksi n-heksana 100	5.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	4.6589	6.6744
	Fraksi n-heksana 50	6.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	5.6589	7.6744
	Fraksi kloroform 400	-5.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-6.3411	-4.3256
	Fraksi kloroform 200	-3.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-4.3411	-2.3256
	Fraksi kloroform 100	1.33333 <sup>*</sup>	.49690	.011	.3256	2.3411
	Fraksi kloroform 50	3.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	2.4922	4.5078
	Fraksi air 400	-2.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-3.6744	-1.6589
	Fraksi air 200	-1.66667 <sup>*</sup>	.49690	.002	-2.6744	-.6589
	Fraksi air 100	1.50000 <sup>*</sup>	.49690	.005	.4922	2.5078
	Fraksi air 50	3.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	2.6589	4.6744
	kotrimoksazol	-8.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-9.0078	-6.9922
	DMSO 1%	15.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	13.9922	16.0078
Fraksi n-heksana 200	ekstrak 400	-8.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-9.0078	-6.9922
	ekstrak 200	-5.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-6.5078	-4.4922
	ekstrak 100	-.66667	.49690	.188	-1.6744	.3411
	ekstrak 50	4.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	3.3256	5.3411
	Fraksi n-heksana 400	-3.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-4.1744	-2.1589
	Fraksi n-heksana 100	2.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	1.4922	3.5078
	Fraksi n-heksana 50	3.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	2.4922	4.5078
	Fraksi kloroform 400	-8.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-9.5078	-7.4922
	Fraksi kloroform 200	-6.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-7.5078	-5.4922
	Fraksi kloroform 100	-1.83333 <sup>*</sup>	.49690	.001	-2.8411	-.8256
	Fraksi kloroform 50	.33333	.49690	.507	-.6744	1.3411
	Fraksi air 400	-5.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-6.8411	-4.8256
	Fraksi air 200	-4.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-5.8411	-3.8256
	Fraksi air 100	-1.66667 <sup>*</sup>	.49690	.002	-2.6744	-.6589
	Fraksi air 50	.50000	.49690	.321	-.5078	1.5078
	kotrimoksazol	-11.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-12.1744	-10.1589
	DMSO 1%	11.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	10.8256	12.8411
Fraksi n-heksana 100	ekstrak 400	-10.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-11.5078	-9.4922
	ekstrak 200	-8.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-9.0078	-6.9922
	ekstrak 100	-3.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-4.1744	-2.1589

	ekstrak 50	1.83333*	.49690	.001	.8256	2.8411
	Fraksi n-heksana 400	-5.66667*	.49690	.000	-6.6744	-4.6589
	Fraksi n-heksana 200	-2.50000*	.49690	.000	-3.5078	-1.4922
	Fraksi n-heksana 50	1.00000	.49690	.052	-.0078	2.0078
	Fraksi kloroform 400	-11.00000*	.49690	.000	-12.0078	-9.9922
	Fraksi kloroform 200	-9.00000*	.49690	.000	-10.0078	-7.9922
	Fraksi kloroform 100	-4.33333*	.49690	.000	-5.3411	-3.3256
	Fraksi kloroform 50	-2.16667*	.49690	.000	-3.1744	-1.1589
	Fraksi air 400	-8.33333*	.49690	.000	-9.3411	-7.3256
	Fraksi air 200	-7.33333*	.49690	.000	-8.3411	-6.3256
	Fraksi air 100	-4.16667*	.49690	.000	-5.1744	-3.1589
	Fraksi air 50	-2.00000*	.49690	.000	-3.0078	-.9922
	kotrimoksazol	-13.66667*	.49690	.000	-14.6744	-12.6589
	DMSO 1%	9.33333*	.49690	.000	8.3256	10.3411
Fraksi n-heksana 50	ekstrak 400	-11.50000*	.49690	.000	-12.5078	-10.4922
	ekstrak 200	-9.00000*	.49690	.000	-10.0078	-7.9922
	ekstrak 100	-4.16667*	.49690	.000	-5.1744	-3.1589
	ekstrak 50	.83333	.49690	.102	-.1744	1.8411
	Fraksi n-heksana 400	-6.66667*	.49690	.000	-7.6744	-5.6589
	Fraksi n-heksana 200	-3.50000*	.49690	.000	-4.5078	-2.4922
	Fraksi n-heksana 100	-1.00000	.49690	.052	-2.0078	.0078
	Fraksi kloroform 400	-12.00000*	.49690	.000	-13.0078	-10.9922
	Fraksi kloroform 200	-10.00000*	.49690	.000	-11.0078	-8.9922
	Fraksi kloroform 100	-5.33333*	.49690	.000	-6.3411	-4.3256
	Fraksi kloroform 50	-3.16667*	.49690	.000	-4.1744	-2.1589
	Fraksi air 400	-9.33333*	.49690	.000	-10.3411	-8.3256
	Fraksi air 200	-8.33333*	.49690	.000	-9.3411	-7.3256
	Fraksi air 100	-5.16667*	.49690	.000	-6.1744	-4.1589
	Fraksi air 50	-3.00000*	.49690	.000	-4.0078	-1.9922
	kotrimoksazol	-14.66667*	.49690	.000	-15.6744	-13.6589
	DMSO 1%	8.33333*	.49690	.000	7.3256	9.3411
Fraksi kloroform 400	ekstrak 400	.50000	.49690	.321	-.5078	1.5078
	ekstrak 200	3.00000*	.49690	.000	1.9922	4.0078
	ekstrak 100	7.83333*	.49690	.000	6.8256	8.8411
	ekstrak 50	12.83333*	.49690	.000	11.8256	13.8411
	Fraksi n-heksana 400	5.33333*	.49690	.000	4.3256	6.3411
	Fraksi n-heksana 200	8.50000*	.49690	.000	7.4922	9.5078

	Fraksi n-heksana 100	11.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	9.9922	12.0078
	Fraksi n-heksana 50	12.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	10.9922	13.0078
	Fraksi kloroform 200	2.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	.9922	3.0078
	Fraksi kloroform 100	6.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	5.6589	7.6744
	Fraksi kloroform 50	8.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	7.8256	9.8411
	Fraksi air 400	2.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	1.6589	3.6744
	Fraksi air 200	3.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	2.6589	4.6744
	Fraksi air 100	6.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	5.8256	7.8411
	Fraksi air 50	9.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	7.9922	10.0078
	kotrimoksazol	-2.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-3.6744	-1.6589
	DMSO 1%	20.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	19.3256	21.3411
Fraksi kloroform 200	ekstrak 400	-1.50000 <sup>*</sup>	.49690	.005	-2.5078	-.4922
	ekstrak 200	1.00000	.49690	.052	-.0078	2.0078
	ekstrak 100	5.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	4.8256	6.8411
	ekstrak 50	10.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	9.8256	11.8411
	Fraksi n-heksana 400	3.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	2.3256	4.3411
	Fraksi n-heksana 200	6.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	5.4922	7.5078
	Fraksi n-heksana 100	9.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	7.9922	10.0078
	Fraksi n-heksana 50	10.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	8.9922	11.0078
	Fraksi kloroform 400	-2.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-3.0078	-.9922
	Fraksi kloroform 100	4.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	3.6589	5.6744
	Fraksi kloroform 50	6.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	5.8256	7.8411
	Fraksi air 400	.66667	.49690	.188	-.3411	1.6744
	Fraksi air 200	1.66667 <sup>*</sup>	.49690	.002	.6589	2.6744
	Fraksi air 100	4.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	3.8256	5.8411
	Fraksi air 50	7.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	5.9922	8.0078
	kotrimoksazol	-4.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-5.6744	-3.6589
	DMSO 1%	18.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	17.3256	19.3411
Fraksi kloroform 100	ekstrak 400	-6.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-7.1744	-5.1589
	ekstrak 200	-3.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-4.6744	-2.6589
	ekstrak 100	1.16667 <sup>*</sup>	.49690	.024	.1589	2.1744
	ekstrak 50	6.16667 <sup>*</sup>	.49690	.000	5.1589	7.1744
	Fraksi n-heksana 400	-1.33333 <sup>*</sup>	.49690	.011	-2.3411	-.3256
	Fraksi n-heksana 200	1.83333 <sup>*</sup>	.49690	.001	.8256	2.8411
	Fraksi n-heksana 100	4.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	3.3256	5.3411
	Fraksi n-heksana 50	5.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	4.3256	6.3411
	Fraksi kloroform 400	-6.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-7.6744	-5.6589

	Fraksi kloroform 200	-4.66667*	.49690	.000	-5.6744	-3.6589
	Fraksi kloroform 50	2.16667*	.49690	.000	1.1589	3.1744
	Fraksi air 400	-4.00000*	.49690	.000	-5.0078	-2.9922
	Fraksi air 200	-3.00000*	.49690	.000	-4.0078	-1.9922
	Fraksi air 100	.16667	.49690	.739	-.8411	1.1744
	Fraksi air 50	2.33333*	.49690	.000	1.3256	3.3411
	kotrimoksazol	-9.33333*	.49690	.000	-10.3411	-8.3256
	DMSO 1%	13.66667*	.49690	.000	12.6589	14.6744
Fraksi kloroform 50	ekstrak 400	-8.33333*	.49690	.000	-9.3411	-7.3256
	ekstrak 200	-5.83333*	.49690	.000	-6.8411	-4.8256
	ekstrak 100	-1.00000	.49690	.052	-2.0078	.0078
	ekstrak 50	4.00000*	.49690	.000	2.9922	5.0078
	Fraksi n-heksana 400	-3.50000*	.49690	.000	-4.5078	-2.4922
	Fraksi n-heksana 200	-.33333	.49690	.507	-1.3411	.6744
	Fraksi n-heksana 100	2.16667*	.49690	.000	1.1589	3.1744
	Fraksi n-heksana 50	3.16667*	.49690	.000	2.1589	4.1744
	Fraksi kloroform 400	-8.83333*	.49690	.000	-9.8411	-7.8256
	Fraksi kloroform 200	-6.83333*	.49690	.000	-7.8411	-5.8256
	Fraksi kloroform 100	-2.16667*	.49690	.000	-3.1744	-1.1589
	Fraksi air 400	-6.16667*	.49690	.000	-7.1744	-5.1589
	Fraksi air 200	-5.16667*	.49690	.000	-6.1744	-4.1589
	Fraksi air 100	-2.00000*	.49690	.000	-3.0078	-.9922
	Fraksi air 50	.16667	.49690	.739	-.8411	1.1744
	kotrimoksazol	-11.50000*	.49690	.000	-12.5078	-10.4922
DMSO 1%	11.50000*	.49690	.000	10.4922	12.5078	
Fraksi air 400	ekstrak 400	-2.16667*	.49690	.000	-3.1744	-1.1589
	ekstrak 200	.33333	.49690	.507	-.6744	1.3411
	ekstrak 100	5.16667*	.49690	.000	4.1589	6.1744
	ekstrak 50	10.16667*	.49690	.000	9.1589	11.1744
	Fraksi n-heksana 400	2.66667*	.49690	.000	1.6589	3.6744
	Fraksi n-heksana 200	5.83333*	.49690	.000	4.8256	6.8411
	Fraksi n-heksana 100	8.33333*	.49690	.000	7.3256	9.3411
	Fraksi n-heksana 50	9.33333*	.49690	.000	8.3256	10.3411
	Fraksi kloroform 400	-2.66667*	.49690	.000	-3.6744	-1.6589
	Fraksi kloroform 200	-.66667	.49690	.188	-1.6744	.3411
	Fraksi kloroform 100	4.00000*	.49690	.000	2.9922	5.0078
	Fraksi kloroform 50	6.16667*	.49690	.000	5.1589	7.1744

	Fraksi air 200	1.00000	.49690	.052	-.0078	2.0078
	Fraksi air 100	4.16667*	.49690	.000	3.1589	5.1744
	Fraksi air 50	6.33333*	.49690	.000	5.3256	7.3411
	kotrimoksazol	-5.33333*	.49690	.000	-6.3411	-4.3256
	DMSO 1%	17.66667*	.49690	.000	16.6589	18.6744
Fraksi air 200	ekstrak 400	-3.16667*	.49690	.000	-4.1744	-2.1589
	ekstrak 200	-.66667	.49690	.188	-1.6744	.3411
	ekstrak 100	4.16667*	.49690	.000	3.1589	5.1744
	ekstrak 50	9.16667*	.49690	.000	8.1589	10.1744
	Fraksi n-heksana 400	1.66667*	.49690	.002	.6589	2.6744
	Fraksi n-heksana 200	4.83333*	.49690	.000	3.8256	5.8411
	Fraksi n-heksana 100	7.33333*	.49690	.000	6.3256	8.3411
	Fraksi n-heksana 50	8.33333*	.49690	.000	7.3256	9.3411
	Fraksi kloroform 400	-3.66667*	.49690	.000	-4.6744	-2.6589
	Fraksi kloroform 200	-1.66667*	.49690	.002	-2.6744	-.6589
	Fraksi kloroform 100	3.00000*	.49690	.000	1.9922	4.0078
	Fraksi kloroform 50	5.16667*	.49690	.000	4.1589	6.1744
	Fraksi air 400	-1.00000	.49690	.052	-2.0078	.0078
	Fraksi air 100	3.16667*	.49690	.000	2.1589	4.1744
	Fraksi air 50	5.33333*	.49690	.000	4.3256	6.3411
	kotrimoksazol	-6.33333*	.49690	.000	-7.3411	-5.3256
	DMSO 1%	16.66667*	.49690	.000	15.6589	17.6744
Fraksi air 100	ekstrak 400	-6.33333*	.49690	.000	-7.3411	-5.3256
	ekstrak 200	-3.83333*	.49690	.000	-4.8411	-2.8256
	ekstrak 100	1.00000	.49690	.052	-.0078	2.0078
	ekstrak 50	6.00000*	.49690	.000	4.9922	7.0078
	Fraksi n-heksana 400	-1.50000*	.49690	.005	-2.5078	-.4922
	Fraksi n-heksana 200	1.66667*	.49690	.002	.6589	2.6744
	Fraksi n-heksana 100	4.16667*	.49690	.000	3.1589	5.1744
	Fraksi n-heksana 50	5.16667*	.49690	.000	4.1589	6.1744
	Fraksi kloroform 400	-6.83333*	.49690	.000	-7.8411	-5.8256
	Fraksi kloroform 200	-4.83333*	.49690	.000	-5.8411	-3.8256
	Fraksi kloroform 100	-.16667	.49690	.739	-1.1744	.8411
	Fraksi kloroform 50	2.00000*	.49690	.000	.9922	3.0078
	Fraksi air 400	-4.16667*	.49690	.000	-5.1744	-3.1589
	Fraksi air 200	-3.16667*	.49690	.000	-4.1744	-2.1589
	Fraksi air 50	2.16667*	.49690	.000	1.1589	3.1744

	kotrimoksazol	-9.50000*	.49690	.000	-10.5078	-8.4922
	DMSO 1%	13.50000*	.49690	.000	12.4922	14.5078
Fraksi air 50	ekstrak 400	-8.50000*	.49690	.000	-9.5078	-7.4922
	ekstrak 200	-6.00000*	.49690	.000	-7.0078	-4.9922
	ekstrak 100	-1.16667*	.49690	.024	-2.1744	-.1589
	ekstrak 50	3.83333*	.49690	.000	2.8256	4.8411
	Fraksi n-heksana 400	-3.66667*	.49690	.000	-4.6744	-2.6589
	Fraksi n-heksana 200	-.50000	.49690	.321	-1.5078	.5078
	Fraksi n-heksana 100	2.00000*	.49690	.000	.9922	3.0078
	Fraksi n-heksana 50	3.00000*	.49690	.000	1.9922	4.0078
	Fraksi kloroform 400	-9.00000*	.49690	.000	-10.0078	-7.9922
	Fraksi kloroform 200	-7.00000*	.49690	.000	-8.0078	-5.9922
	Fraksi kloroform 100	-2.33333*	.49690	.000	-3.3411	-1.3256
	Fraksi kloroform 50	-.16667	.49690	.739	-1.1744	.8411
	Fraksi air 400	-6.33333*	.49690	.000	-7.3411	-5.3256
	Fraksi air 200	-5.33333*	.49690	.000	-6.3411	-4.3256
	Fraksi air 100	-2.16667*	.49690	.000	-3.1744	-1.1589
		kotrimoksazol	-11.66667*	.49690	.000	-12.6744
	DMSO 1%	11.33333*	.49690	.000	10.3256	12.3411
kotrimoksazol	ekstrak 400	3.16667*	.49690	.000	2.1589	4.1744
	ekstrak 200	5.66667*	.49690	.000	4.6589	6.6744
	ekstrak 100	10.50000*	.49690	.000	9.4922	11.5078
	ekstrak 50	15.50000*	.49690	.000	14.4922	16.5078
	Fraksi n-heksana 400	8.00000*	.49690	.000	6.9922	9.0078
	Fraksi n-heksana 200	11.16667*	.49690	.000	10.1589	12.1744
	Fraksi n-heksana 100	13.66667*	.49690	.000	12.6589	14.6744
	Fraksi n-heksana 50	14.66667*	.49690	.000	13.6589	15.6744
	Fraksi kloroform 400	2.66667*	.49690	.000	1.6589	3.6744
	Fraksi kloroform 200	4.66667*	.49690	.000	3.6589	5.6744
	Fraksi kloroform 100	9.33333*	.49690	.000	8.3256	10.3411
	Fraksi kloroform 50	11.50000*	.49690	.000	10.4922	12.5078
	Fraksi air 400	5.33333*	.49690	.000	4.3256	6.3411
	Fraksi air 200	6.33333*	.49690	.000	5.3256	7.3411
	Fraksi air 100	9.50000*	.49690	.000	8.4922	10.5078
	Fraksi air 50	11.66667*	.49690	.000	10.6589	12.6744
	DMSO 1%	23.00000*	.49690	.000	21.9922	24.0078
DMSO 1%	ekstrak 400	-19.83333*	.49690	.000	-20.8411	-18.8256



ekstrak 200	-17.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-18.3411	-16.3256
ekstrak 100	-12.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-13.5078	-11.4922
ekstrak 50	-7.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-8.5078	-6.4922
Fraksi n-heksana 400	-15.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-16.0078	-13.9922
Fraksi n-heksana 200	-11.83333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-12.8411	-10.8256
Fraksi n-heksana 100	-9.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-10.3411	-8.3256
Fraksi n-heksana 50	-8.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-9.3411	-7.3256
Fraksi kloroform 400	-20.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-21.3411	-19.3256
Fraksi kloroform 200	-18.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-19.3411	-17.3256
Fraksi kloroform 100	-13.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-14.6744	-12.6589
Fraksi kloroform 50	-11.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-12.5078	-10.4922
Fraksi air 400	-17.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-18.6744	-16.6589
Fraksi air 200	-16.66667 <sup>*</sup>	.49690	.000	-17.6744	-15.6589
Fraksi air 100	-13.50000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-14.5078	-12.4922
Fraksi air 50	-11.33333 <sup>*</sup>	.49690	.000	-12.3411	-10.3256
kotrimoksazol	-23.00000 <sup>*</sup>	.49690	.000	-24.0078	-21.9922

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