

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR
DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* ATCC 25922**



Oleh:

**Suryani
20144269A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR
DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* ATCC 25922**

 **SKRIPSI**
*Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Mencapai
Derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh:

**Suryani
20144269 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul:

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR
DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* ATCC 25922**

Oleh:

Suryani
20144269 A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 28 Juni 2018



Mengetahui
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi

Dekan,

Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., MSc., Apt

Pembimbing Utama

Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt

Pembimbing Pendamping

Drs. Edy Prasetya, M.Si.

Penguji :

1. Dr. Ana Indrayati, S.Si., M.Si.
2. Dr. Drs. Supriyadi, M.Si.
3. Ghani Nurfiana, M.Farm., Apt.
4. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt.

1.

2.

3.

4.

HALAMAN PERSEMBAHAN

Tidak ada kesuksesan bagiku melainkan dengan pertolongan Allah

(Q.S Huud:88)

Allah akan mengangkat derajat orang-orang berilmu dan bertakwa di antara kamu sekalian

(Q.S Al-Mujadilah: 11)

Skripsi ini kupersembahkan kepada:

Allah Subhanahu wa Ta'ala

Ayah, Ibu, Mbak Marni, Mbak Tutty, Adik Ismail, Adik Haikal dan seluruh keluarga tercinta yang telah mendukung dan mendoakanku.

Partner in everything Bro Cornelis Artho, Para Sahabat, Rekan Satu Tim dan Anak-Anak Wisma Putri Blue Ocean yang selalu memberikan dukungan dan motivasi.

Teman - teman seperjuangan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

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 di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

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

Surakarta, 28 Juni 2018



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI n-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz) TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* ATCC 25922”**. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

Penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, baik secara moril maupun materiil. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Vivin Nopiyanti, S.Farm.,M.Sc., Apt. selaku Pembimbing Utama dan Drs. Edy Prasetya, M.Si. selaku Pembimbing Pendamping yang telah berkenan mengorbankan waktunya guna membimbing, memberi nasehat, dan mengarahkan penulis pada saat penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Dosen penguji yang telah memberikan masukan demi kesempurnaan dalam skripsi ini.
5. Seluruh Dosen, Asisten Dosen, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi.
6. Ayah, Ibu, Mbak Marni, Mbak Tutty, Adik Ismail, Adik Haikal serta seluruh keluarga besarku yang telah memberikan cinta, kasih sayang, doa, dukungan dan pengorbanan, serta semangat untuk segera menyelesaikan skripsi ini.
7. Sahabat dan teman-teman atas bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan penelitian skripsi ini.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan oleh karena itu, penulis sangat menerima kritikan atau saran yang bersifat membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang mempelajarinya.

Surakarta, 28 Juni 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xv
ABSTRACT	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Daun Singkong	5
1. Sistematika tanaman	5
2. Nama daerah.....	5
3. Morfologi tanaman	6
3.1 Akar.....	6
3.2 Batang.....	6
3.3 Daun.....	6
3.4 Bunga.....	6
3.5 Buah.....	7
4. Khasiat	7
5. Kandungan kimia.....	7
5.1. Flavonoid.....	8
5.2. Saponin.....	8
5.3. Tanin.....	8

B.	Simplisia	9
1.	Pengertian simplisia.....	9
2.	Pengambilan simplisia.....	9
3.	Pengeringan simplisia.....	9
C.	Ekstraksi.....	10
1.	Pengertian ekstraksi.....	10
2.	Maserasi.....	10
3.	Fraksinasi.....	11
4.	Cairan penyari.....	11
4.1	Etanol.....	11
4.2	<i>n</i> -Heksan.....	12
4.3	Etil asetat.....	12
4.4	Air.....	12
D.	Diare.....	12
E.	<i>Escherichia coli</i>	13
1.	Sistematika <i>Escherichia coli</i>	13
2.	Morfologi dan Identifikasi.....	14
3.	Fisiologi <i>Escherichia coli</i>	14
F.	Antibakteri	15
1.	Definisi antibakteri	15
2.	Mekanisme antibakteri.....	15
2.1	Menghambat metabolisme sel bakteri.....	15
2.2	Menghambat sintesis dinding sel bakteri.....	15
2.3	Menggangu permeabilitas membran sel bakteri.....	16
2.4	Menghambat sintesis protein sel bakteri.....	16
2.5	Menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri.....	16
3.	Uji Aktivitas Antibakteri	16
G.	Media	17
H.	Sterilisasi.....	18
I.	Kotrimoksazol.....	18
J.	Landasan Teori	19
K.	Hipotesis	21

BAB III METODE PENELITIAN

A.	Populasi dan Sampel.....	22
B.	Variabel Penelitian.....	22
1.	Identifikasi variabel utama	22
2.	Klasifikasi variabel utama	22
3.	Definisi operasional variabel utama	23
C.	Alat dan Bahan.....	24
1.	Alat	24
2.	Bahan	24
2.1	Bahan utama.....	24
2.2	Bahan kimia.....	24
2.3	Medium.....	24
2.4	Bakteri Uji.....	24

D.	Jalannya Penelitian	25
1.	Determinasi dan identifikasi tumbuhan.....	25
2.	Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk daun singkong	25
3.	Penetapan kadar lembab	25
4.	Pembuatan ekstrak daun singkong secara maserasi.....	25
5.	Uji bebas etanol	26
6.	Fraksinasi	26
7.	Pengujian kandungan kimia ekstrak daun singkong.....	28
7.1	Identifikasi flavonoid.	28
7.2	Identifikasi saponin.	28
7.3	Identifikasi tanin.....	28
8.	Identifikasi bakteri uji.....	28
8.1	Identifikasi bakteri uji secara makroskopis.....	29
8.2	Identifikasi mikroskopis bakteri uji dengan pewarnaan Gram.	29
8.3	Identifikasi bakteri uji secara biokimia.....	29
9.	Sterilisasi	31
10.	Pembuatan suspensi bakteri uji.....	31
11.	Pengujian aktivitas antibakteri daun singkong	31
11.1	Pengujian antibakteri secara difusi.....	31
11.2	Pengujian antibakteri secara dilusi.....	33
E.	Analisis Data.....	35
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		36
A.	Hasil Penelitian	36
1.	Hasil Identifikasi tanaman singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	36
1.1	Determinasi tanaman.....	36
1.2	Deskripsi tanaman.....	36
2.	Hasil pengumpulan bahan, pengeringan, dan pembuatan serbuk daun singkong	37
3.	Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun singkong	38
4.	Hasil pembuatan ekstrak etanol 70% daun singkong	38
5.	Hasil uji bebas etanol daun singkong	39
6.	Fraksinasi ekstrak daun singkong.....	40
7.	Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun singkong ...	39
8.	Identifikasi bakteri uji.....	40
8.1	Identifikasi secara makroskopis	41
8.2	Identifikasi bakteri secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram.	41
8.3	Hasil identifikasi biokimia.....	41
9.	Hasil pembuatan suspensi bakteri uji	43
10.	Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun singkong	43
10.1	Hasil pengujian antibakteri secara difusi.	43
10.2	Hasil pengujian antibakteri daun singkong secara dilusi.....	47

BAB V	KESIMPILAN DAN SARAN	49
	A. Kesimpulan	49
	B. Saran	49
	DAFTAR PUSTAKA.....	50
	LAMPIRAN	55

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tanaman singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	5
Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol daun singkong	26
Gambar 3. Pembuatan fraksi ekstrak etanol daun singkong	27
Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan metode difusi.....	32
Gambar 5. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksinasi daun singkong terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara dilusi.	34

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun singkong	38
Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan daun singkong	38
Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun singkong	38
Tabel 4. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun singkong	39
Tabel 5. Rendemen hasil fraksinasi <i>n</i> -heksan, etil asetat, dan air dari daun singkong	39
Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun singkong	Error! Bookmark not defined.
Tabel 7. Hasil identifikasi biokimia <i>Escherichia coli</i>	411
Tabel 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksinasi daun singkong terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara difusi .	44
Tabel 9. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun singkong terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Determinasi daun singkong	56
Lampiran 2. Foto daun dan serbuk daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	57
Lampiran 3. Foto ekstrak dan fraksinasi daun singkon	58
Lampiran 4. Alat penelitian	59
Lampiran 5. Foto hasil uji bebas etanol dan identifikasi kandungan kimia ekstrak daun singkong.....	60
Lampiran 6. Hasil identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara makroskopis dan mikroskopis	61
Lampiran 7. Hasil identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara biokimia.....	62
Lampiran 8. Hasil uji antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara difusi	63
Lampiran 9. Hasil uji antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) terhadap bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara dilusi	64
Lampiran 10. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah	65
Lampiran 11. Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	66
Lampiran 12. Perhitungan rendemen fraksi n-heksan dari daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	67
Lampiran 13. Perhitungan rendemen fraksi etil asetat dari daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	68
Lampiran 14. Perhitungan rendemen fraksi air dari daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	69
Lampiran 15. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi n-heksan, etil asetat, dan air pada metode difusi.....	70

Lampiran 16. Pembuatan larutan stok dengan berbagai konsentrasi pada metode dilusi.....	71
Lampiran 17. Formulasi dan pembuatan media	73
Lampiran 18. Statistik.....	76

INTISARI

SURYANI, 2018 UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI n-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI EKSTRAK DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) mengandung senyawa flavonoid, saponin, dan tannin yang digunakan sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan untuk mengetahui nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi paling aktif dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Daun singkong diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan air. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% dan metode dilusi dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%.

Hasil penelitian menunjukkan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun singkong mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Fraksi etil asetat merupakan fraksi paling aktif yaitu pada konsentrasi 50% dengan rata-rata diameter zona hambat 19,66 mm. Hasil dilusi menunjukkan nilai Konsentrasi Bunuh Minimum 12,5%.

Kata kunci : Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz), *Escherichia coli* ATCC 25922, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, antibakteri

ABSTRACT

SURYANI, 2018, ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF n-HEXANE FRACTION, ETHYL ACETATE, AND WATER FROM ETHANOL EXTRACT OF CASSAVA LEAVES (*Manihot esculenta* Crantz) AGAINST *Escherichia coli* ATCC 25922, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) contains flavonoid, saponins, and tannins which is used as an antibacterials. The aim of this research is to know the antibacterial activity of n-hexane fraction, ethyl acetate, and water from ethanol extract of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) against *Escherichia coli* ATCC 25922 bacteria and to know the value of Minimum Inhibitor Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) the most active fraction of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) against *Escherichia coli* ATCC 25922.

Cassava leaves were extracted by maceration method using 70% ethanol solvent. The extract obtained was fractionated with n-hexane, ethyl acetate, and water solvents. Testing of antibacterial activity using diffusion method with concentration 50%, 25%, 12,5% and dilution method with concentration 50%; 25%; 12.5%; 6.25%; 3.12%; 1.56%; 0.78%; 0.39%; 0.19%; 0.09%.

The results showed that the fraction of n-hexane, ethyl acetate, and water from ethanol extract of cassava leaves had antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922 bacteria. Ethyl acetate fraction is the most active fraction that is at concentration 50% with mean inhibitory zone diameter 19,66 mm. The dilution results show the value of Minimum Bactericidal Concentration (MBC) is 12.5%.

Keywords: Cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz), *Escherichia coli* ATCC 25922, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction, water fraction, antibacterial

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Penyakit diare merupakan salah satu penyakit utama yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat Indonesia pada saat ini. Angka kejadian diperkirakan 20-50 kejadian diare per 100 penduduk setiap tahunnya (Paramitha *et al.* 2010). Diare adalah gangguan pencernaan yang ditandai dengan penurunan konsentrasi tinja (menjadi lunak atau cair) dalam waktu 24 jam. Gambaran secara klinis diare adalah buang air besar dengan frekuensi tiga kali atau lebih sehingga menyebabkan badan lesu dan lemas, tidak nafsu makan, serta muntah (Kairupan *et al.* 2014).

Salah satu penyebab penyakit diare adalah bakteri *Escherichia coli*. *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri penyebab diare akut pada anak-anak maupun orang dewasa, karena mengkonsumsi air atau makanan yang telah tercemar oleh *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan infeksi pada usus dan dapat menyebabkan diare (Jawetz *et al.* 2012). Bakteri *Escherichia coli* adalah salah satu jenis bakteri Gram negatif, berbentuk batang pendek (kokobasil), mempunyai flagel, dan merupakan kuman oportunistik yang banyak ditemukan di usus besar manusia sebagai flora normal. Bakteri *Escherichia coli* dapat berubah menjadi patogen jika pertumbuhan di dalam tubuh melebihi batas normal akibat perubahan makanan secara mendadak serta perubahan suhu lingkungan. Mekanisme kerja *Escherichia coli* dapat menyebabkan diare dengan cara memproduksi enterotoksin yang berlebih sehingga menimbulkan invasi pada lapisan epitelium dinding usus yang menyebabkan peradangan dan kekurangan cairan tubuh. Kebanyakan pasien yang terinfeksi bakteri ini mengalami gejala seperti diare, mual, dan kejang abdomen. Lamanya penyakit ini rata-rata 5 hari (Procop dan Cockrill 2003).

Pengobatan tradisional telah lama digunakan dan merupakan bagian integral dari budaya suatu daerah (Permatasari *et al.* 2015). Masyarakat telah menerima dan membuktikan manfaat dan kegunaan tumbuhan sebagai obat dan

juga untuk memelihara kesehatan. Salah satu alternatif pengobatan untuk penyakit diare adalah dengan menggunakan tanaman obat (Defrin *et al.* 2010). Salah satu tanaman obat yang digunakan oleh mayoritas masyarakat untuk mengobati diare adalah daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) karena memiliki kandungan flavonoid, saponin dan tanin. Senyawa–senyawa tersebut diketahui mempunyai aktivitas sebagai antibakteri (Miladiyah *et al.* 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Mutia *et al.* (2017) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*. Hal ini dapat terlihat dari semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang digunakan maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk, sehingga konsentrasi ekstrak uji berbanding lurus dengan efek aktivitas antibakteri. Nilai KHM ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap bakteri *Escherichia coli* yaitu 0,0625 % dengan diameter hambat 10,55 mm. Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka peneliti tertarik melakukan penelitian untuk menguji potensi dari fraksi-fraksi daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Penelitian ini perlu dilakukan untuk menguji aktivitas fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap *Escherichia coli*. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan golongan senyawa dan menarik senyawa kimia yang mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* sesuai sifat kepolaran pelarut yang digunakan. Senyawa tersebut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda-beda, dimana senyawa flavonoid bersifat semi polar, sedangkan saponin dan tanin bersifat polar sehingga digunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda pula.

Metode yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas dari bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa zona atau daerah yang dinggap

sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap mikroorganisme yang diperiksa (Jawets *et al.* 2007). Metode dilusi berguna untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) (Pratiwi 2008).

B. Perumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini adalah:

Pertama, apakah fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922?

Kedua, manakah dari fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922?

Ketiga, berapakah nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi paling aktif dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

Pertama, untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, untuk mengetahui manakah yang memiliki aktivitas antibakteri paling aktif diantara fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, untuk mengetahui nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi paling aktif dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, informasi, dan tambahan pengetahuan kepada seluruh lapisan masyarakat tentang aktivitas daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) untuk mengatasi masalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* khususnya dengan lebih memanfaatkan tanaman ini untuk pengobatan tradisional dan menambah wawasan tentang sumber obat alami dari tumbuhan yang terdapat di Indonesia. Penelitian ini diharapkan berguna bagi peneliti lain sebagai acuan atau tambahan informasi dalam melakukan penelitian terhadap daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) sebagai antibakteri.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Daun Singkong

1. Sistematika tanaman

Kedudukan tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dalam sistematika taksonomi adalah:



Gambar 1. Tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta (Tumbuhan berbiji)
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae (Biji berkeping dua)
Bangsa	: Euphorbiales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: Manihot
Jenis	: <i>Manihot esculenta</i> Crantz (Purwono dan Purnamawati 2007)

2. Nama daerah

Singkong atau ketela pohon mempunyai banyak nama daerah seperti ketela, keutila, ubi kayee (Aceh), ubi parancih (Minangkabau), ubi singkung (Jakarta), batata kayu (Manado), bistugkel (Sunda), bolet, kasawe, kaspa, kaspe, ketela budin, katela jendral, katela kaspe, katela mantri, katela marikan, katela menyog, katela poug, katela prasman, katela sabekong, katela samunah, katela

tapah, katela cengkol, telo pohung (Jawa), blandong, manggala menyok, puhung, pohog, sabhrang balandha, sawe, sawi, tela balandha, tengsag (Madura), kesawi, ketela kayu, sabrang sawi (Bali), kasubi (Gorontalo), lame kayyu (Makasar), lame aju (Bugis), kasibi (Ternate, Tidore) (Purwono 2009).

3. Morfologi tanaman

3.1 Akar. Tanaman singkong mempunyai sistem perakaran serabut, panjang akar 30-50 cm dengan diameter 2-5cm, termasuk tumbuhan dikotil, akar mengembung berisi cadangan makanan yang dapat digunakan sebagai sumber karbohidrat. Akar dapat tumbuh bercabang 4-8 di dasar batang. Akar ditutupi dengan lapisan berwarna coklat berserat atau bisa disebut kulit ari dan dapat hilang ketika dikupas. Bagian dalamnya (daging) berwarna putih / kekuning-kuningan bergetah dan bentuknya lebih keras daripada kentang namun tetap sama berisi kadar pati yang tinggi (Richardo 2012).

3.2 Batang. Batang tanaman singkong berkayu berlubang dan berisi empulur berwarna putih lunak dengan struktur seperti gabus memiliki warna batang bervariasi, ketika umur masih muda berwarna hijau dan setelah tua menjadi keputih-putihan, kelabu, atau hijau kelabu, dalam batang berwarna putih kekuning-kuningan, memiliki panjang setinggi 3 m dengan diameter setebal 2-4 cm dengan bentuk batang beruas-ruas (Tjitrosoepomo 2005).

3.3 Daun. Permukaan daun rata, tulang daun menjari bercabang 5-9, jenis daun tunggal, berwarna hijau (berklorofil), tangkai daun berwarna merah, ujung daun lancip dengan tangkai panjang dan berwarna kemerahan. Daun singkong dapat digunakan sebagai obat tradisional karena kandungan kimianya (Richardo 2012).

3.4 Bunga. Bunga pada tanaman singkong merupakan bunga berumah satu (monoeseus) dengan penyerbukan silang. Bunga ini memiliki tenda bunga tunggal yang berukuran 1 cm. Bunga ini berada dalam tandan yang tidak rapat dan terkumpul pada ujung batang. Bunga betina pada tanaman singkong ini berbentuk seperti cincin dengan tangkai putik (stylus) yang bersatu. Bunga betina juga memiliki tenda bunga serta tonjolan penebalan dasar bunga (recetaculum) yang berwarna kuning mengelilingi calon buah. Sedangkan bunga jantan pada tanaman

singkong mempunyai tenda bunga yang berbentuk lonceng dan tertancap disekitar penebalan dasar bunga serta berlekuk (Richardo 2012).

3.5 Buah. Buah pada tanaman singkong disebut sebagai umbi. Umbi pada tanaman singkong terbentuk dari akar yang berubah bentuk dan fungsinya sebagai tempat penyimpanan makanan cadangan. Bentuk umbi pada tanaman singkong bermacam-macam, namun kebanyakan berbentuk silinder, bercabang, meruncing, bulat, dan memanjang. Sedangkan daging umbi mengandung zat pati berwarna putih gelap dan tanaman menghasilkan 5-10 buah (Richardo 2012).

4. Khasiat

Daun singkong banyak dimanfaatkan sebagai tanaman obat tradisional, antara lain sebagai anti kanker, mencegah kontipasi dan anemia, serta meningkatkan daya tahan tubuh. Kandungan vitamin dan mineralnya rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan sayuran daun lain. Kandungan vitamin A dan C pada daun singkong berperan sebagai antioksidan yang mencegah proses penuaan dan meningkatkan daya tahan tubuh terhadap serangan penyakit. Kandungan kalsium yang tinggi sangat baik untuk mencegah penyakit tulang seperti rematik dan asam urat (Adi 2016).

Dari berbagai analisis disebutkan, daun singkong dapat membantu mengubah karbohidrat menjadi energi, membantu pemulihan kulit dan tulang, meningkatkan daya ingat, kinerja otak dan metabolisme asam amino lain. Kandungan serat pada daun singkong yang cukup tinggi dapat membantu melancarkan buang air besar. Dalam setiap 100 gram daun singkong mengandung 3.300 RE vitamin A yang baik untuk kesehatan mata dan vitamin C sebanyak 275 mg yang baik untuk mencegah sariawan, dan meningkatkan kekebalan tubuh, membantu menangkal radikal bebas, mengurangi rasa sakit, mempercepat penyembuhan, anti bakteri dan melindungi sel dari kerusakan oksidasi. Selain itu daun singkong juga berkhasiat untuk mengatasi rematik dan mencegah proses penuaan (Sintia & Murhananto 2004).

5. Kandungan kimia

Kandungan gizi tanaman singkong terutama selain umbinya yang bisa dimanfaatkan untuk bahan pangan adalah bagian daunnya, bagian daunnya

menyimpan berbagai macam protein yang cukup tinggi, dapat digunakan sebagai sumber energi yang setara dengan karbohidrat yakni dalam 100 gram daun singkong mengandung 73 kalori, 6,8 gram protein, 1,2 gram lemak, 13 gram karbohidrat, 165 mg kalsium, 54 mg fosfor, 2mg zat besi, 11.000 SI vitamin A, 0,12 mg vitamin B, 275 mg vitamin C, 77,2 gr air (Rukamana 2002; Hariana 2006). Kandungan mineral yaitu berupa kalsium 165mg, zat besi 2,8 mg, thiamin 0,16mg, riboflavin 0,32 mg, beta-caroten 0,08mg, niasin 1,8mg, dan asam askorbin 82 mg (Ayu 2002).Kandungan pada daun singkong yang diduga berperan sebagai antibakteri antara lain flavonoid, saponin, dan tanin (Mutia *et al.* 2017).

5.1. Flavonoid. Flavonoid merupakan golongan polifenol sehingga memiliki sifat kimia senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Flavonoid juga memiliki sejumlah gugus hidroksil sehingga pada umumnya larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, air dan sebagainya. Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Dewanti & Wahyudi 2011).

5.2. Saponin. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang dapat membentuk sabun, pada konsentrasi rendah dapat menghemolisis sel darah merah. Penyarian senyawa saponin akan memberikan hasil yang lebih baik sebagai antibakteri bila menggunakan pelarut etanol 70%. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah melibatkan pembentukan kompleks dengan sterol pada membran plasma sehingga menghancurkan semi permeabilitas sel, kemudian mengarah pada kematian sel (Kumalasari dan Sulistyani 2011).

5.3. Tanin. Tanin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dan disintesis oleh tanaman. Tanin tergolong senyawa polifenol yang karakteristiknya dapat membentuk senyawa kompleks. Tanin larut dalam pelarut organik polar namun tidak larut dalam pelarut organik non polar (Jayanegara *et al.* 2008).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia berasal dari kata simpel yang berarti satu atau sederhana, oleh karena itu istilah simplisia dipakai untuk menyebutkan bahan obat yang masih alami dan belum mengalami perubahan bentuk atau umumnya berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibagi berdasarkan 3 golongan, yaitu: simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan/mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh. Simplisia hewani adalah bagian hewan yang masih utuh, belum diolah atau diolah dengan sederhana. Simplisia mineral sama dengan hewani dan nabati belum mengalami pengolahan dan masih berbentuk bahan kimia murni (Gunawan & Mulyani 2004).

2. Pengambilan simplisia

Bagian simplisia yang diambil dari tanaman, misalnya daun, bunga, buah, akar atau rimpang. Pada beberapa tanaman, zat berkhasiat tidak terdapat pada seluruh bagian dari tanaman, ada bagian dari tanaman justru beracun dan tidak dikehendaki. Bagian tanaman yang ingin dikumpulkan seperti daun sebaiknya tidak tercampur dengan bagian lain dari tanaman seperti biji, bunga, atau tangkai. Pengumpulan simplisia juga perlu memperhatikan kondisi khusus, misalnya pemanenan daun yang dilakukan sewaktu daun masih muda atau ketika masih tunas (Dalimartha 2008).

3. Pengeringan simplisia

Pengeringan bertujuan menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang bisa menguraikan lebih lanjut kandungan zat aktif dan memudahkan dalam hal pengelolaan proses selanjutnya. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses pengeringan yaitu waktu pengeringan, suhu pengeringan, kelembaban udara dan kelembaban bahan, ketebalan bahan, sirkulasi udara dan luas permukaan bahan (Gunawan & Mulyani 2004). Kadar lembab serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%, kadar lembab kurang dari 10% menyebabkan sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tidak tumbuh sehingga bahan lebih awet (Katno *et al.* 2008).

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, flavonoid, alkaloid, dan lain-lain. Senyawa aktif yang diketahui terkandung dalam simplisia akan mempermudah pilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Depkes RI 2000). Ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah waktu pengekstraksian, keasaman (pH), suhu dan perbandingan sampel dengan pelarut (Handa *et al.* 2008)

Ekstrak adalah sediaan yang dapat berupa kering, kental, atau cair, dibuat dengan cara menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang sesuai, yaitu maserasi, soxletasi, perkolasi atau penyeduhan dengan air mendidih. Cairan penyari yang dapat digunakan berupa air, eter atau campuran etanol dalam air (Anief 2003).

2. Maserasi

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

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai keseimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugiannya adalah pengerjaannya lama, membutuhkan pelarut yang banyak dan penyarian kurang sempurna. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada

keseimbangan. Kelebihan dari metode maserasi adalah dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani 2014).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dengan golongan utama yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Pemisahan jumlah dan jenisnya menjadi fraksi yang berbeda, mula-mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari dengan pelarut kurang polar, dan yang terakhir dengan pelarut polar (Harborne 2007).

4. Cairan penyari

Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Cairan penyari yang baik adalah murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak memengaruhi zat berkhasiat (Depkes RI, 1986). Cairan penyari yang digunakan dapat berupa air, etanol, air etanol, atau pelarut lain.

4.1 Etanol. Pelarut ideal yang sering digunakan adalah alkohol atau campurannya dengan air yang merupakan pelarut pengekstraksi yang mempunyai extractive power yang terbaik untuk hampir semua senyawa yang mempunyai berat molekul rendah seperti alkaloid, saponin dan flavonoid (Arifianti *et al.* 2014). Pelarut etanol lebih mudah menembus membran sel untuk mengekstrak bahan intraseluler dari bahan tanaman. Hampir semua komponen diidentifikasi dari tanaman yang aktif terhadap mikroorganisme adalah senyawa organik aromatik atau jenuh, mereka paling sering diperoleh melalui etanol atau ekstraksi metanol. Metanol lebih polar dari pada etanol tetapi karena sifat sitotoksik, maka metanol tidak cocok untuk uji aktivitas antibakteri karena dapat menyebabkan hasil yang salah (Tiwari *et al.* 2011).

4.2 *n*-Heksan. Pelarut *n*-heksana merupakan pelarut nonpolar berupa cairan yang jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar dan mempunyai bau seperti eter lemah atau bau seperti petroleum, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa nonpolar, misalnya golongan kandungan kimia minyak atsiri, lemak dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid, dan karotenoid (Tiwari *et al.* 2011).

4.3 Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut yang mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas rendah (Wardhani & Sulistyani 2012). Etil asetat bersifat semi polar sehingga mampu menarik senyawa aglikon maupun glikon flavonoid. Etil asetat dapat digunakan sebagai pelarut karena dapat menarik senyawa golongan flavonoid, saponin, tanin, dan polifenol (Putri *et al.* 2013).

4.4 Air. Air adalah pelarut universal, digunakan untuk ekstrak tanaman dengan produk aktivitas antimikroba. Air digunakan sebagai penyari karena murah, mudah diperoleh, stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah. Air melarutkan minyak menguap, glikosida, flavonoid, tanin, gula, gom, pati, protein, enzim, lilin, pektin, zat warna dan asam organik. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan karena zat ikut tersari sehingga zat lain yang tidak diperlukan mengganggu proses penyarian (Depkes 1986; Tiwari *et al.* 2011).

D. Diare

Diare adalah frekuensi Buang Air Besar (BAB) yang abnormal akibat kondisi ketidakseimbangan absorpsi air, sekresi air dan elektrolit dengan feses yang tidak berbentuk atau cair yang frekuensinya lebih dari 3 kali dalam 24 jam. Frekuensi dan konsistensi BAB bervariasi antar individu. Mekanisme kerja terjadinya diare infeksi meliputi penempelan bakteri pada sel epitel dengan atau tanpa adanya kerusakan mukosa, invasi mukosa, dan produksi enterotoksin atau sitotoksin (Cielsa dan Guerrant 2003).

Beberapa hal yang dapat menyebabkan diare termasuk bakteri *Salmonella typhi*, *Camphylobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli*, virus *Rotavirus*, *Norovirus*, parasite *Cryptosporidium*, *Giardia*, racun bakteri dari *Staphylococcus* dan beberapa senyawa seperti laksatif, antasida yang mengandung magnesium, antineoplastik, prostaglandin, dan obat antiinflamasi non steroid (Sukandar *et al.* 2013).

E. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit diare. Mekanisme kerja *Escherichia coli* dalam menyebabkan diare dengan cara memproduksi enterotoksin yang berlebih sehingga menimbulkan invasi pada lapisan epitelium dinding usus yang menyebabkan peradangan dan kekurangan cairan tubuh. Kebanyakan pasien yang terinfeksi bakteri ini mengalami gejala seperti diare, mual, dan kejang abdomen. Lamanya penyakit ini rata-rata 5 hari (Procop dan Cockreril 2003).

Infeksi oleh *Escherichia coli* dapat diobati dengan melihat acuan pada guideline The Treatment of Diarrhoea: a Manual for Physicians and Other Senior Health Workers yaitu menggunakan kortimoksazol sebagai lini pertama (WHO 2005). Kortimoksazol merupakan antibiotik yang mengandung kombinasi sulfametaksazol dan trimethoprim yang mempunyai spektrum luas sebagai antibakteri (Ganiswara 2007).

1. Sistematika *Escherichia coli*

Divisi	: Protophyta
Sub divisi	: Schizomycetea
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Enterobacteriaceae
Marga	: <i>Escherichia</i>
Jenis	: <i>Escherichia coli</i> (Jawets <i>et al.</i> 2012)

2. Morfologi dan Identifikasi

Escherichia coli termasuk dalam famili Enterobacteriaceae yang berupa bakteri gram negatif dan merupakan flora normal yang banyak di temukan di saluran usus manusia. Bakteri ini berbentuk batang pendek (kokobasil), berderet seperti rantai, mempunyai flagel, berukuran $0,4 \mu\text{m} - 0,7 \mu\text{m} \times 1,4 \mu\text{m}$ dan mempunyai simpai, pada biakan *Endo Agar* akan membentuk koloni berwarna merah dengan kilat logam yang permanen, *Escherichia coli* tumbuh dengan baik di hampir semua media pembenihan, dapat meragi laktosa atau memecahkan karbohidrat dengan membentuk asam dan gas (Maksum 2002). *Escherichia coli* dapat hidup soliter maupun berkoloni, umumnya motil, tidak memnbentuk spora, serta fakultatif anaerob (Carter & Wise 2004).

Kebanyakan strain di dalam usus bersifat non patogen yang tidak membahayakan dan dapat membantu fungsi normal dan nutrisi. Bakteri *Escherichia coli* bisa menjadi patogen apabila mencapai jaringan di luar saluran pencernaan khususnya saluran air kemih bisa menyebabkan ISK (Infeksi Saluran Kemih), saluran empedu, di aliran darah dapat menyebabkan sepsis, di paru-paru atau di peritoneum dapat menyebabkan peradangan.

Sebagian besar penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Escherichia coli* ditularkan melalui makanan yang tidak dimasak dan daging yang terkontaminasi. Penularan penyakit infeksi ini dapat terjadi melalui kontak langsung dan biasanya terjadi di tempat yang memiliki sanitasi dan lingkungan yang kurang bersih (Jawets *et al.* 2012).

3. Fisiologi *Escherichia coli*

Escherichia coli tumbuh baik dalam temperatur antara $8^{\circ}\text{C} - 48^{\circ}\text{C}$ dan temperatur optimum 37°C . *Esherichia coli* menghasilkan kolisin, yang dapat melindungi saluran pencernaan dari bakteri usus yang patogenik, dipakai sebagai indikator untuk menguji adanya pencemaran air oleh tinja. *Escherichia coli* bersifat lateral yaitu peritrik dimna flagel tersebar dari ujung-ujung sampai pada sisi. Rata-rata pergerakan bakteri *Escherichia coli* kira-kira 25 m/detik atau 10 cm/jam. Flagel berguna untuk bergerak, melekat, dan konjugasi. *Escherichia coli* berada dalam medium yang mengandung sumber karbon makan akan mengubah

derajat asam (pH) dalam medium menjadi asam dan akan membentuk gas sebagai hasil proses terurainya glukosa menjadi senyawa lain (Melliawati 2009).

F. Antibakteri

1. Definisi antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba yang merugikan. Obat pembasmi bakteri bersifat toksisitas selektif setinggi mungkin dalam arti bersifat sangat toksik untuk bakteri, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, antibakteri terdapat dua sifat yaitu menghambat pertumbuhan bakteri (aktivitas bakteristatik) dan membunuh bakteri (aktivitas bakterisid). Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimal dan kadar bunuh minimal. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi dalam lima kelompok, yaitu mengganggu metabolisme sel bakteri, menghambat sintesis dinding sel bakteri, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, menghambat sintesis protein sel bakteri dan menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri (Gunawan *et al.* 2009).

2. Mekanisme antibakteri

2.1 Menghambat metabolisme sel bakteri. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari Asam Para Amino Benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat nonfungsional, sehingga kebutuhan akan asam folat tidak terpenuhi, hal ini bisa menyebabkan bakteri mati (Gunawan *et al.* 2009).

2.2 Menghambat sintesis dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri terdiri dari polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Gunawan *et al.* 2009).

2.3 Mengganggu permeabilitas membran sel bakteri. Selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Gunawan *et al.* 2009).

2.4 Menghambat sintesis protein sel bakteri. Bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Antibakteri bekerja dalam menyebabkan kode pada mRNA yang salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein yang abnormal dan fungsional bagi sel mikroba (Gunawan *et al.* 2009).

2.5 Menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri. Contoh pada rifampisin yang berikatan dengan enzim polimerase RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA sel mikroba begitu juga dengan golongan kuinolon yang menghambat enzim DNA girase pada kuman yang berfungsi membentuk kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa memuat sel kuman yang kecil sekalipun (Gunawan *et al.* 2009).

3. Uji Aktivitas Antibakteri

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

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode lubang/sumuran dan metode cakram kertas. Metode lubang/sumuran didasarkan pada kemampuan senyawa-senyawa antibakteri yang diuji untuk menghasilkan jari-jari zona penghambatan di sekeliling sumur uji terhadap bakteri yang digunakan sebagai penguji (Nurainy *et al.* 2008).

Metode dilusi dilakukan untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) masing-masing fraksi terhadap bakteri *Escherichia coli*. Pertumbuhan bakteri yang terhambat atau kematian bakteri akibat suatu zat antibakteri dapat disebabkan oleh penghambatan terhadap metabolisme sel mikroba, sintesis

dinding sel, penghambatan terhadap permeabilitas membran sel, penghambatan terhadap sintesis protein, dan penghambatan terhadap sintesis asam nukleat. Secara garis besar bakteri gram positif lebih rentan terhadap antibakteri karena memiliki lapisan peptidoglikan pada bagian luar yang permeabel sedangkan bakteri Gram negatif memiliki membran fosfolipid yang tersusun atas polisakarida sehingga membuat dinding sel gram negatif impermeabel terhadap antibakteri (Ravikumar *et al.* 2011).

Parameter yang digunakan dalam uji ini adalah Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada uji dilusi. Hasil KBM diperoleh dengan mengamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pelarut DMSO membantu melarutkan fraksi polar, semi polar, dan non polar sehingga fraksi dapat terdistribusi merata pada media. Kadar obat di bawah Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menunjukkan bahwa efek terapi tidak akan tercapai. Nilai KBM suatu obat terhadap bakteri berubah sesuai perkembangan resistansinya. Fraksi teraktif diujikan secara difusi untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum (KHM). Nilai diameter hambat adalah kemampuan dari fraksi teraktif daun turi untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Prasetyo 2012).

G. Media

Media adalah tempat mikroba untuk tumbuh dan mengandung nutrisi yang tepat untuk kehidupan mikroba yang akan dibiakan, media tumbuh menyediakan berbagai bahan yang diperlukan mikroba untuk hidup dan memperbanyak diri. Mikroba dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik, di dalam media diperlukan persyaratan tertentu, yaitu media harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba. Media harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba. Media harus dalam keadaan steril artinya sebelum ditanami mikroba yang dimaksud, tidak ditumbuhi mikroba lain (Abdurahman, 2008).

Bentuk media ada tiga jenis yaitu media padat, media cair, dan media semi padat atau semi cair. Pertama, media padat. Bahan media padat ditambahkan antara 12-15 gram tepung agar per 1000 mL media. Media ini pada umumnya

dipergunakan untuk bakteri, ragi, jamur, dan kadang-kadang juga mikroalga. Kedua, media cair. Media cair tidak ditambahkan zat pematat, biasanya media cair dipergunakan untuk pembiakan mikroalga tetapi mikroba lain, terutama bakteri dan ragi. Ketiga, media semi padat atau semi cair. Penambahan zat pematat dalam media ini hanya 50% atau kurang dari seharusnya. Media ini umumnya dipergunakan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup anaerob atau fakultatif (Suriawiria, 2005).

H. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang digunakan di dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang mengganggu atau merusak media ataupun mengganggu kehidupan dan proses yang dilakukan (Waluyo 2004).

Tindakan sterilisasi yang dapat dilakukan meliputi: pertama, sterilisasi secara fisik yaitu dengan pemanasan, penggunaan sinar gelombang pendek seperti sinar UV, dan dengan radiasi. Kedua, sterilisasi secara kimiawi yaitu memakai bahan kimia misal dengan menggunakan desinfektan larutan alkohol dan larutan formalin. Ketiga, sterilisasi secara mekanik yaitu dengan penggunaan saringan atau filter dengan pori-pori halus sehingga dapat menahan bakteri. Media agar yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat yang dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan autoklaf dan yang tidak ada ukurannya disterilkan dengan oven pada suhu 170°C-180°C selama 2 jam, alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Dan terakhir sterilisasi intkas menggunakan formalin (Denyer 2004).

I. Kotrimoksazol

Kotrimoksazol dalam penelitian ini digunakan sebagai pembanding (kontrol positif) karena memiliki spektrum yang luas sebagai antibakteri dan memiliki frekuensi terjadinya resistensi yang lebih rendah. Kotrimoksazol merupakan kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol digunakan dalam bentuk

kombinasi karena sifatnya sinergistik. Trimetoprim dan sulfametoksazol menghambat reaksi enzimatis obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba. Spektrum antibakteri trimetoprim sama dengan sulfametoksazol. *Escherichia coli* spesies merupakan salah satu mikroba yang peka terhadap kotrimoksazol. Mekanisme antibakterinya berdasar atas kerjanya pada tahap yang berurutan dalam reaksi enzimatis untuk membentuk asam tetrahidrofolat. Sulfametoksazol menghambat masuknya molekul PABA ke dalam asam folat dan trimetoprim menghambat terjadinya reaksi reduksi dari dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat. Tetrahidrofolat penting untuk reaksi-reaksi pemindahan satu atom C, seperti pembentukan basa purin dan beberapa asam amino. Trimetoprim menghambat enzim dihidrofolat reduktase mikroba secara sangat selektif. Kombinasi ini mungkin efektif walaupun mikroba telah resisten terhadap trimetoprim. Sinergisme maksimum akan terjadi bila mikroba peka terhadap kedua komponen (Gunawan *et al.* 2009). Keuntungan penting lain dari kombinasi ini adalah timbulnya resistensi lebih lambat daripada komponen-komponennya sendiri. Hal ini adalah jelas, karena bakteri yang menjadi resistensi untuk satu komponen masih dapat dimusnahkan oleh yang lain (Tjay & Rahardja 2002).

J. Landasan Teori

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit diare. Mekanisme kerja *Escherichia coli* dalam menyebabkan diare dengan cara memproduksi enterotoksin yang berlebih sehingga menimbulkan invasi pada lapisan epitelium dinding usus yang menyebabkan peradangan dan kekurangan cairan tubuh. Kebanyakan pasien yang terinfeksi bakteri ini mengalami gejala seperti diare, mual, dan kejang abdomen. Lamanya penyakit ini rata-rata 5 hari (Procop dan Cockrill 2003).

Salah satu tanaman obat yang digunakan oleh mayoritas masyarakat untuk mengobati diare adalah daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang memiliki kandungan flavonoid, saponin dan tanin. Senyawa-senyawa tersebut diketahui mempunyai aktivitas sebagai antibakteri (Miladiyah *et al.* 2011). Senyawa flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa

kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Dewanti & Wahyudi 2011). Saponin merupakan senyawa yang diduga sebagai senyawa antibakteri karena memiliki kemampuan dalam menghambat fungsi membran sel sehingga merusak permeabilitas membran yang mengakibatkan dinding sel rusak atau hancur (Ayuningtyas 2008). Tanin dapat berikatan dengan sel mikroorganisme dan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim (Ajizah 2004).

Penelitian yang dilakukan oleh Mutia *et al.* (2017) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*. Hal ini dapat terlihat dari semakin besar konsentrasi maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk, sehingga konsentrasi ekstrak uji berbanding lurus dengan efek aktivitas antibakteri. Nilai KHM ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap bakteri *Escherichia coli* yaitu 0,0625 % dengan diameter hambat 10,55 mm.

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama, kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa nonpolar, misalnya golongan kandungan kimia minyak atsiri, lemak dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid, dan karotenoid (Tiwari *et al.* 2011). Etil asetat merupakan senyawa semi polar dan dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan triterpenoid (Putri *et al.* 2013). Air melarutkan glikosida, flavonoid, tanin, dan gula (Depkes, 1986). Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dilakukan untuk mengetahui diameter zona hambat terhadap bakteri uji sehingga didapatkan fraksi teraktif, dan setelah didapatkan fraksi teraktif dilanjutkan dengan metode dilusi. Metode difusi dilakukan pada fraksi teraktif saja untuk mengetahui konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap *Escherichia coli*.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Hidayat (2012) bahwa fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanolik batang kembang bulan (*Tithonia diversifolia* A.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC

25922. Metode difusi fraksi *n*-heksan memiliki daya hambat rata-rata 17,67 mm dan 15,67 mm pada konsentrasi 75% dan 50%. Fraksi etil asetat memiliki daya hambat rata-rata 21,33 mm, 19,67 mm, dan 16,33 mm pada konsentrasi 75%, 50%, dan 25%. Fraksi air memiliki daya hambat rata-rata 14,67 mm dan 12,67 mm pada konsentrasi 75% dan 50%. Metode dilusi fraksi *n*-heksan dan fraksi air memiliki konsentrasi bunuh minimum pada konsentrasi 50%, sedangkan fraksi etil asetat pada konsentrasi 25%. Fraksi paling aktif etil asetat diuji kandungan kimia secara kualitatif dengan tabung reaksi dan KLT. Hasil identifikasi menunjukkan fraksi etil asetat positif mengandung senyawa saponin, polifenol, flavonoid, dan alkaloid.

K. Hipotesis

Berdasarkan teori dan hasil penelitian terdahulu, maka dapat ditentukan hipotesis sebagai berikut :

Pertama, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, fraksi etil asetat merupakan fraksi paling aktif dari ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, dapat menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi paling aktif dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang diperoleh dari salah satu kebun di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang diambil pada bulan Januari 2018. Tanaman daun singkong yang diambil memiliki daun yang masih muda, berwarna hijau, diambil dari tanaman yang masih segar, terbebas dari hama.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah serbuk daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang diekstraksi dengan etanol 70% dilanjutkan dengan fraksinasi yang menggunakan *n*-Heksan sebagai pelarut non polar, etil asetat sebagai pelarut semi polar, dan air sebagai pelarut polar.

Variabel utama kedua adalah aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap bakteri *Escherichia coli*.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang biasa diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya, hasil yang didapatkan tidak menyebar dan dapat dilakukan peneliti lain secara tepat. Variabel

tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Escherichia coli*, kondisi laboratorium (meliputi: kondisi inkas, alat, dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, waktu panen, pemilihan daun, dan metode ekstraksi. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah berbagai variasi konsentrasi dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz). Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan *Escherichia coli* yang dipengaruhi oleh ekstrak fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun singkong adalah daun dari tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang diambil dari salah satu kebun di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yaitu serbuk yang diperoleh dari daun singkong yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir dimaksudkan agar kotoran yang menempel dapat hilang, dikeringkan dengan oven suhu 50°C, selanjutnya diblender dan diayak dengan pengayak nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun singkong adalah hasil ekstraksi serbuk daun singkong yang dibuat dengan cara mengekstrak serbuk dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.

Keempat, fraksi *n*-heksana daun singkong adalah hasil fraksi ekstrak.

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

Keenam, fraksi air daun singkong adalah residu dari hasil fraksinasi ekstrak etil asetat daun singkong dengan pelarut air.

Ketujuh, bakteri uji dari penelitian ini adalah *Escherichia coli* yang di dapat dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

Kedelapan, metode difusi dengan menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air yaitu

dengan membuat sumuran. Kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif adalah kotrimoksazol.

Kesembilan, metode dilusi dengan menentukan konsentrasi daya bunuh minimum (KBM) yaitu berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,09%. Kontrol negatif adalah fraksi teraktif dan kontrol positif adalah suspensi bakteri.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan antara lain : oven, blender untuk membuat serbuk, alat maserasi berupa botol mulut lebar warna coklat, gelas ukur, pembakar spirtus, kaki tiga, kertas saring, selang, corong penyaring, rotary evaporator, timbangan analitik, erlenmeyer, batang pengaduk, tabung reaksi, cawan petri, inkas, jarum ose, pinset, vial, spuit, labu alas bulat, rak tabung, mikroskop, moisture balance, pipet ukur, corong pisah, autoklaf, inkubator.

2. Bahan

2.1 Bahan utama. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz). Daun singkong diperoleh dari salah satu kebun di Tawangmangu, Jawa Tengah.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut *n*-heksana, etil asetat, etanol 70%, aquadestilata, serbuk Mg, FeCl₃, safraninin (gram D), alkohol (gram C), larutan Kristal violet (gram A), larutan mordant (gram B), DMSO 5%, reagen mayer, reagen dragendrof.

2.3 Media. Media yang digunakan BHI (Brain Heart Infusion), MHA (Mueller Hinton Agar), SIM (Sulfida Indol Motility), KIA (Kligler Iron Agar), LIA (Lysine Iron Agar), Citrat, EA (Endo Agar).

2.4 Bakteri Uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi dan identifikasi tumbuhan

Tahapan pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah identifikasi tumbuhan singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang dilakukan di bagian Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Sebelas Maret. Identifikasi ini bertujuan untuk mencocokkan ciri makroskopis dan mikroskopis, selain itu juga berfungsi untuk mencocokkan ciri morfologi yang ada pada daun singkong (*Manihot Esculenta* Crantz).

2. Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk daun singkong

Daun singkong yang sudah disortasi basah, dicuci bersih dengan air mengalir, dikeringkan dengan di oven pada suhu 50°C selama 2-3 hari yang bertujuan untuk mengurangi kadar air untuk mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Simplisia yang telah kering dihaluskan dengan blender kemudian diayak dengan menggunakan ayakan no. 40.

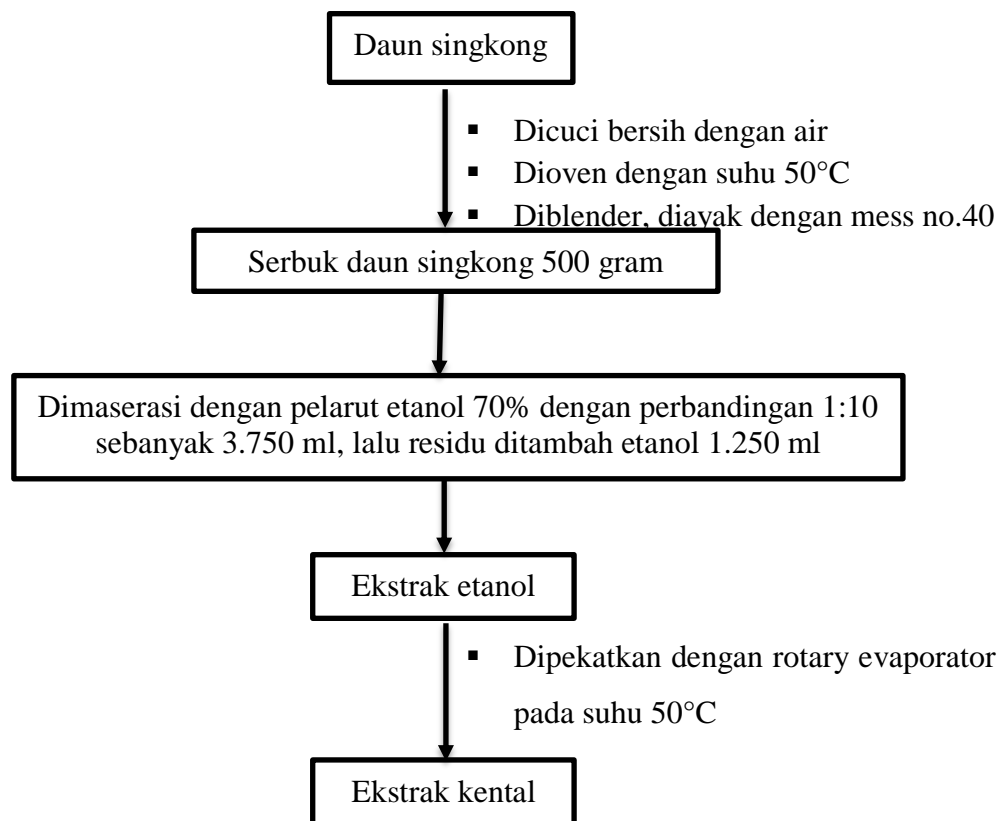
3. Penetapan kadar lembab

Penetapan kadar kelembaban serbuk daun singkong pada penelitian ini dilakukan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Penetapan kadar kelembaban serbuk daun singkong dilakukan dengan menggunakan alat moisture balance. Serbuk ditimbang 2 gram, dimasukkan ke dalam alat moisture balance yang telah di atur suhunya sebesar 110°C. Kemudian moisture ditutup dan ditunggu sampai ada bunyi pada alat sebagai tanda. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat moisture balance dicatat sebagai kadar kelembaban.

4. Pembuatan ekstrak daun singkong secara maserasi

Pembuatan ekstrak dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Serbuk daun singkong sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat, dengan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 3.750 ml. Ekstraksi dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojog berulang-ulang. Maserat yang didapatkan selama 5 hari diperas dengan kain flanel dan disaring. Residu kemudian ditambahkan etanol 1.250 ml dimasukkan ke dalam botol dengan sekali diaduk dan dibiarkan selama 2 hari.

Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental.



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol daun singkong

5. Uji bebas etanol

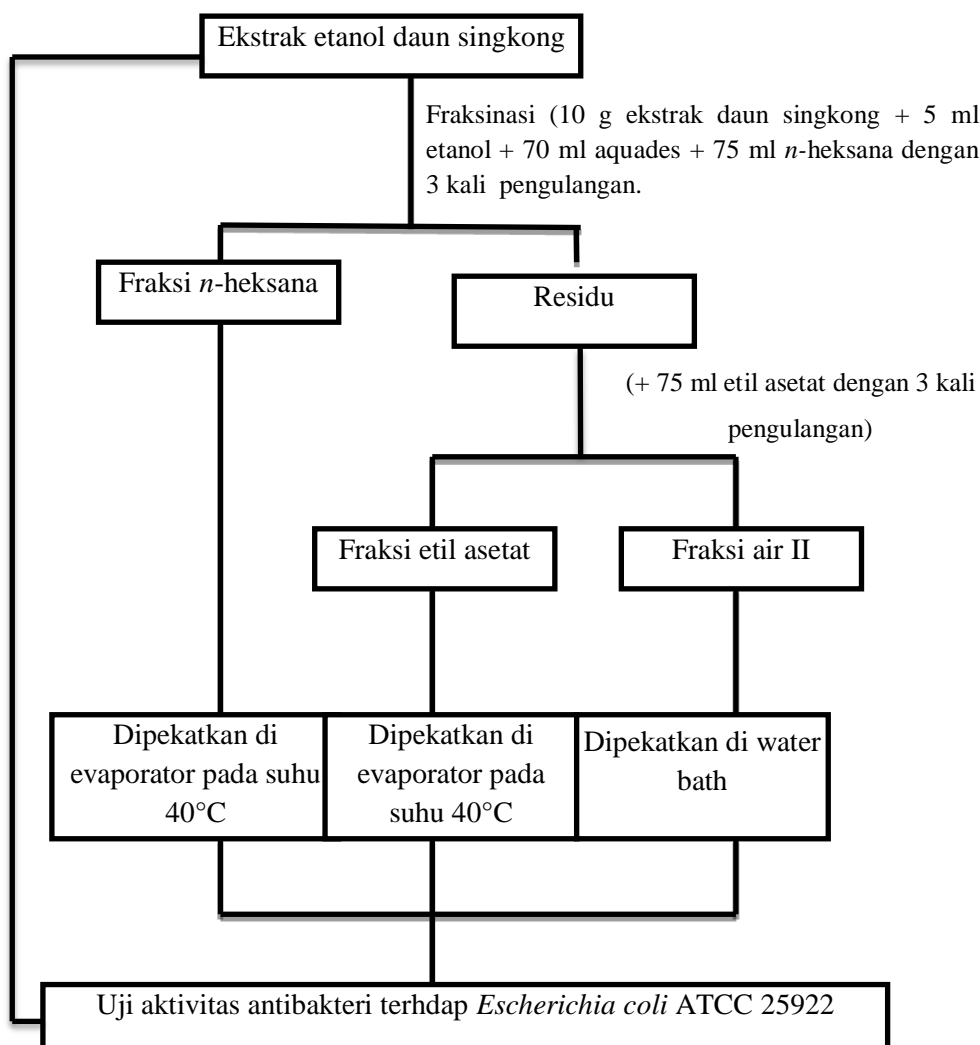
Ekstrak yang telah pekat diuji sudah bebas etanol atau belum dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol jika tidak tercium bau eter yang khas dari etanol. Tujuan dilakukannya tes bebas etanol ini bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri (Kurniawati 2015).

6. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang 10 gram ekstrak daun singkong kemudian dilarutkan dengan etanol 5 ml dan pelarut air 70 ml sampai terdispersi sempurna. Kemudian dilakukan fraksinasi dengan *n*-heksana 75 ml dilakukan sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah. Fraksi *n*-heksana merupakan filtrat yang terletak di atas dan fraksi air merupakan filtrat yang

terletak di bawah. Fraksi *n*-heksana kemudian dipisahkan dari fraksi air dan dipekatkan di evaporator pada suhu 40°C (Rahmawati *et al.* 2015).

Fraksi air sisa dari fraksi *n*-heksana kemudian difraksinasi kembali dengan 75 ml etil asetat sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah. Fraksi etil asetat merupakan filtrat yang terletak di atas dan fraksi air merupakan filtrat yang terletak di bawah. Fraksi etil asetat dipisahkan dari fraksi air kemudian dipekatkan di evaporator pada suhu 40°C (Rahmawati *et al.* 2015). Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air yang kemudian dikentalkan di waterbath (Rahmawati *et al.* 2015).



Gambar 3. Pembuatan fraksi ekstrak etanol daun singkong

7. Pengujian kandungan kimia ekstrak daun singkong

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak daun singkong dan juga fraksi teraktif dari ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz).

7.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak sebanyak $\pm 0,5$ g dicampurkan dengan aquadestilata. Setelah itu, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 0,5 mg bubuk Mg dan ditambahkan 1 ml HCl pekat dan ambil alkohol. Dicampur dan dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah 2014).

7.2 Identifikasi saponin. Ekstrak sebanyak $\pm 0,5$ g ditambahkan aquadestilata, kemudian dipanaskan selama 2 sampai 3 menit. Setelah dipanaskan tunggu sampai dingin lalu kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil dan setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang menandakan adanya kandungan saponin (Ramyashree *et al.* 2012).

7.3 Identifikasi tanin. Ekstrak sebanyak $\pm 0,5$ g ditambahkan aquadestilata sampai terendam dan dipanaskan selama 3 sampai 5 menit. Kemudian ditambahkan 2 tetes larutan NaCl 10% lalu direaksikan dengan menambahkan FeCl₃. Perubahan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Ramyashree *et al.* 2012).

8. Identifikasi bakteri uji

Escherichia coli termasuk dalam famili Enterobacteriaceae yang berupa bakteri gram negatif dan merupakan flora normal yang banyak di temukan di saluran usus manusia. Bakteri ini berbentuk batang pendek (kokobasil), berderet seperti rantai, mempunyai flagel, berukuran $0,4 \mu\text{m} - 0,7 \mu\text{m} \times 1,4 \mu\text{m}$ dan mempunyai simpai, pada biakan Endo Agar akan membentuk koloni berwarna merah dengan kilat logam yang permanen, *Escherichia coli* tumbuh dengan baik di hampir semua media pembenihan, dapat meragi laktosa atau memecahkan karbohidrat dengan membentuk asam dan gas (Maksum 2002). *Escherichia coli* dapat hidup soliter maupun berkoloni, umumnya motil, tidak memnbentuk spora, serta fakultatif anaerob (Carter & Wise 2004).

8.1 Identifikasi bakteri uji secara makroskopis. Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasi pada media selektif *Endo Agar* (EA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Berdasarkan pengamatan koloni yang dihasilkan berwarna merah dengan kilat logam yang permanen. Warna koloni merah disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* dan koliform memetabolisme laktosa menjadi aldehyd dan asam sehingga aldehyd bereaksi dengan fuchsin. Aldehyd akan melepaskan fuchsin dari senyawa fuchsin-sulfat kemudian akan mewarnai koloni merah dan akan terlihat berwarna seperti kilat logam (Kartika et al. 2014).

8.2 Identifikasi mikroskopis bakteri uji dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa bakteri tersebut golongan bakteri *Escherichia coli*. Gram negatif didapatkan bila sel berwarna merah, bentuk bacilli berarti positif golongan *Escherichia coli*. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat ulasan (smear) yang difiksasi kemudian ditetesi Kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, didiamkan selama kurang lebih 1 menit, kemudian dicuci dengan aquades mengalir lalu ditetesi dengan mordant iodine (Gram B), didiamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci kembali dengan aquades mengalir dan dikering anginkan. Preparat dilunturkan dengan Gram C (alkohol) sampai alkohol yang jatuh berwarna jernih, lalu dicuci dengan aquades mengalir. Preparat ditetesi Gram D (safranin) dan ditunggu 45 detik kemudian dicuci dengan aquades mengalir setelah itu preparat dikeringkan dengan kertas tissue yang ditempelkan di sisi ulasan lalu didiamkan sampai mongering di udara dan diamati di bawah mikroskop (Volk dan Wheller 1988).

8.3 Identifikasi bakteri uji secara biokimia. Identifikasi berdasarkan uji biokimia dengan menggunakan media SIM, KIA, LIA, dan Citrat.

8.3.1 Media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Biakan murni diinokulasi pada permukaan media dengan cara diinokulasi tusukan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif bila media berwarna hitam, uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah dengan reagen Erlich A dan B, uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan

bakteri pada seluruh media. Hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasi, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagella. Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan dengan sulfida negative, indol positif, motility positif (++) (Sri, 2016).

8.3.2 Media KIA (*Kliger Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+). Pada bagian miring, jika bakteri dapat memfermentasi laktosa dan sukrosa, warna media berubah menjadi kuning. Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan dengan A/AGS⁻ (Sri 2016).

8.3.3 Media LIA (*Lysine Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi tusukan dan goresan kemudian diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi berfungsi untuk menguji lisin dan sulfida. Selanjutnya diamati bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna coklat (ditulis R), berwarna ungu (ditulis K), berwarna kuning (ditulis A), serta terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+). Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan dengan K/KS⁻ (Sri 2016).

8.3.4 Media Citrat. Biakan bakteri diinokulasi goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Bakteri yang memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon akan menghasilkan natrium karbonat yang bersifat alkali, sehingga dengan adanya indikator 1brom thymol blue menyebabkan warna biru pada media. Uji positif bila media berwarna biru dan negatif jika media tertap berwarna hijau. Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan dengan hasil sitrat negatif (Sri 2016).

9. Sterilisasi

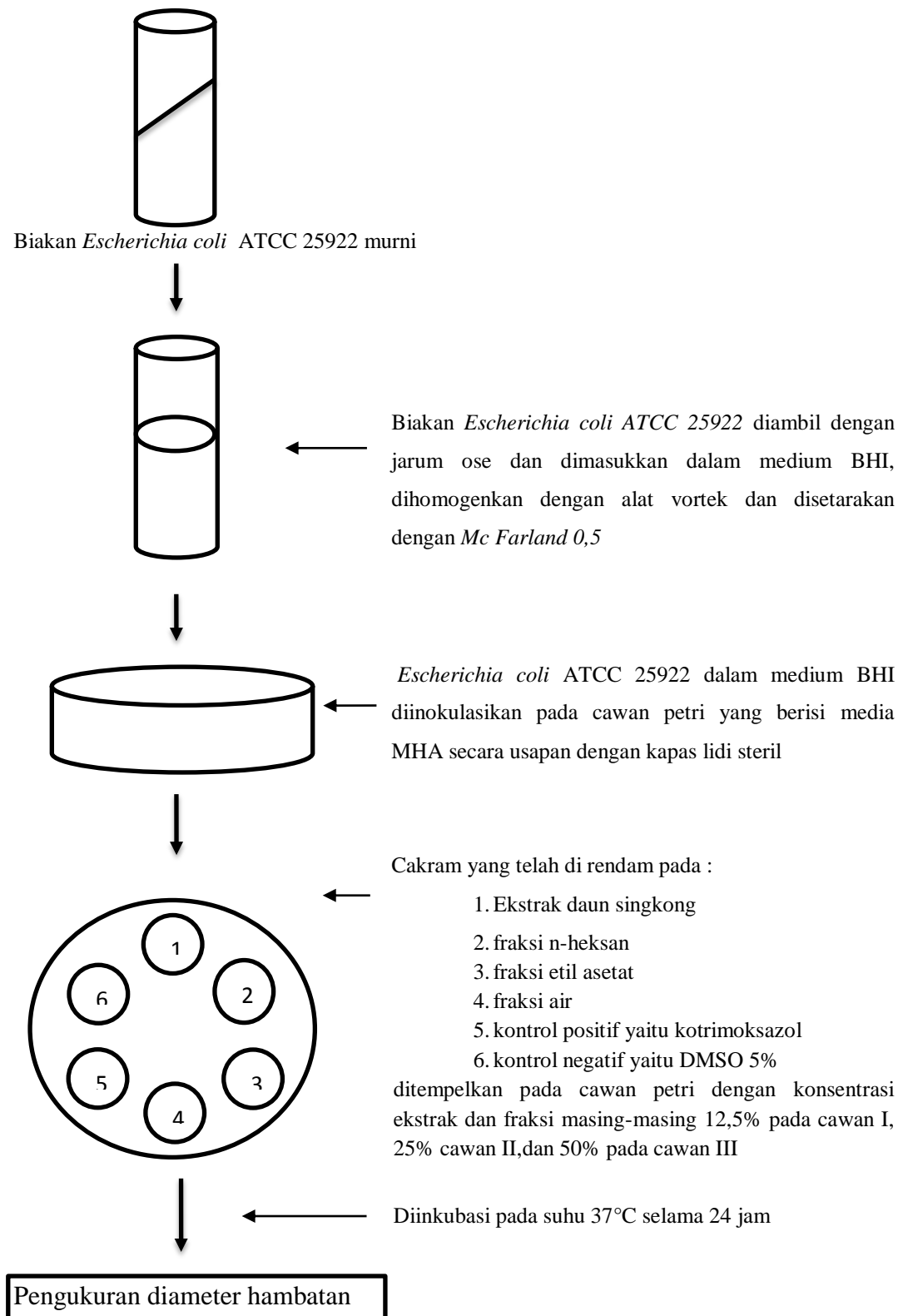
Semua peralatan yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan, dibungkus kertas dan disterilkan dengan oven pada suhu 200°C selama 1-2 jam dan media yang akan digunakan diuji mikrobiologi disterilkan dengan autoclave 121°C selama 15-20 menit (Sari *et al.* 2010).

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi dengan mengambil *Escherichia coli* biakan murni kurang lebih satu ose kemudian dipindahkan kedalam tabung yang berisi media BHI lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 jam. Diperoleh suspensi bakteri dengan kekeruhan sama dengan standar Mc farland 0,5 yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ ml. Jika kekeruhan belum sesuai standar maka dilakukan pengenceran 1:1000, selanjutnya digunakan untuk identifikasi (Bonang & Koeswandoro 1982).

11. Pengujian aktivitas antibakteri daun singkong

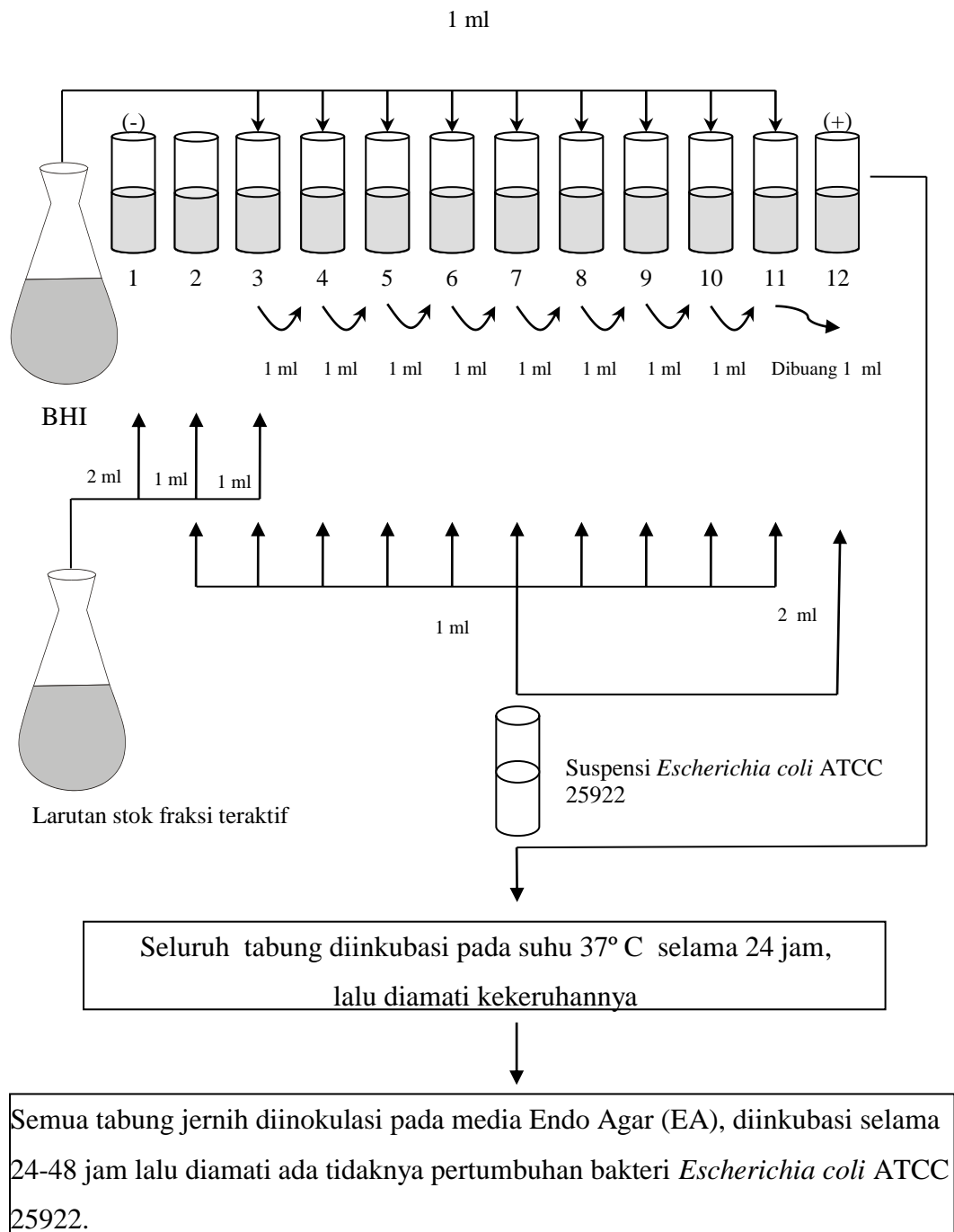
11.1 Pengujian antibakteri secara difusi. Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Ekstrak etanol daun singkong yang telah difraksinasi menggunakan fraksi *n*-Heksan, etil asetat, dan air masing-masing dibuat pada konsentrasi 12,5%, 25%, dan 50%. Metode difusi menggunakan 3 cawan petri steril yang telah diisi dengan media MHA sebanyak 30 ml. Secara aseptis pada cawan petri digoresi suspensi bakteri menggunakan lidi steril dengan metode perataan (*Spread plate Method*) dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Uji ini menggunakan metode cakram disk. Cakram berukuran 6 mm dicelupkan masing-masing dalam ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, kotrimoksazol sebagai kontrol positif, dan pelarut DMSO 5% sebagai kontrol negatif pada 3 seri konsentrasi fraksi dan direndam selama 2 jam. Setelah itu cakram diletakkan atau ditempelkan pada media MHA dengan menggunakan pinset pada tiap cawan. Kemudian cawan diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya, setelah itu diukur diameter zona hambat di sekitar cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar cakram menandakan bahwa kandungan kimia daun singkong memiliki daya hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.



Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi.

11.2 Pengujian antibakteri secara dilusi. Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dari fraksi teraktif. Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung yang terdiri dari 12 tabung. Konsentrasi larutan stok yang dibuat adalah 50%, kemudian diencerkan dengan pelarut DMSO 5%. Secara aseptis dari larutan stok tersebut dibuat deret konsentrasi di bawahnya yaitu dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09% , suspensi bakteri *Escherichia coli* sebagai kontrol positif (+) dan larutan stok fraksi sebagai kontrol negatif (-). Media BHI dimasukkan 1 ml pada tabung 3 sampai tabung 11. Secara aseptis, masukkan 2 ml larutan stok fraksi pada tabung 1 sebagai kontrol negatif (-) , kemudian pada tabung 2 dan 3 dimasukkan 1 ml larutan stok fraksi, kemudian dari tabung 3 dipipet 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung 4 begitu seterusnya sampai tabung 11 kemudian dibuang. Tambahkan 1 ml biakan bakteri dari tabung 2 sampai tabung 11 dan 2 ml pada tabung 12 sebagai kontrol positif (+). Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan cara menentukan konsentrasi terendah larutan uji dari tabung yang jernih. Tabung yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif *Endo Agar* (EA) diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 24-48 jam. Diamati ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media selektif *Endo Agar* (EA) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.



Gambar 5. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksinasi daun singkong terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara dilusi.

E. Analisis Data

Hasil uji aktivitas bakteri ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap bakteri *Escherichia coli* dianalisis berdasarkan nilai zona hambat yang terbentuk menggunakan metode difusi. Hasil data yang diperoleh dianalisis menggunakan statistik metode One Way Anova.

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Hasil Identifikasi tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

1.1 Determinasi tanaman. Determinasi tanaman pada penelitian ini bertujuan untuk menetapkan keberadaan yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi baik secara makroskopi maupun mikroskopi tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap kepustakaan yang dibuktikan di laboratorium. Determinasi tanaman daun singkong dilakukan di unit Laboratorium Biologi Universitas Sebelas Maret.

Berdasarkan hasil determinasi tersebut dinyatakan bahwa tanaman yang diteliti adalah tanaman *Manihot esculenta* Crantz. Dengan hasil determinasi sebagai berikut: 1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73a. **Familia 99. Euphorbiaceae** 1b-3b-4b-6b-73b-80b-81b-84b-85a-86b-87b-88a-89a. **48. Manihot** 1a. *Manihot esculenta* Crantz. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

1.2 Deskripsi tanaman. Daun singkong termasuk tanaman habistus : perdu, menahun, tumbuh tegak, bergetah, tinggi 2-7 m. Akar: tunggang, kalau diperbanyak dengan stek akan membentuk akar serabut yang kemudian berkembang menjadi umbi akar, umbi akar besar, panjang, kulit berwarna coklat suram, daging umbi berwarna putih hinggakuning. Batang: bulat, berkayu, sedikit bercabang atau tidak bercabang sama sekali, di bagian tengah terdapat jaringan gabus, di permukaan batang terdapat bekas dudukan tangkai daun yang bertonjolan, licin dan gundul, putih kotor. Daun : tunggal, tersusun berseling, bentuk helaian daun bulat, diameter 5-20cm, pangkal tumpul hingga membulat, tepi berbagi menjari dengan 5-9 cangap, cangapnya berbentuk bulat telur memanjang hinggamenggaris-lanset, ujung cangap runcing, lebar 1-6cm, ujung helaian daun membulat, pertulangan menjari, permukaan atas hijau tua dan permukaan bawah hijau muda, licin dan gundul; tangkai daun bulat, hijau hingga

hijau kemerahan, licin dan gundul, panjang 6-35cm; daun penumpu sepasang, dekat pangkal tangkai daun, berlepasan, ujungnya rata, mudah rontok. Bunga : majemuk tipe tandan, 3-5 tandan berkumpul diujung batang, pada bagian pangkal terdapat bunga betina, di bagian atas terdapat bunga jantan, panjang tenda bunga 1 cm. Bunga jantan : panjang tangkai bunga 4-6 mm, tenda bunga berbentuk lonceng, bertaju 5, benangsari 10, berseling panjang dan pendek, tertancap di sekitar penebalan dasar bunga yang kuning dan berlekuk. Bunga betina : panjang tangkai bunga 1,5-2,5 cm, kelopak bunga lebih besar daripada bunga jantan, tenda bunga berbagi 5, bakal buah dikelilingi oleh tonjolan penebalan dasar bunga yang berbentuk cincin, kuning, tangkai putik bersatu, sangat pendek, dengan kepala putik yang lebar berwarna kuning mentega dan berlekuk banyak. Buah : berbentuk seperti bola atau telur, dengan 6 papan yang membujur seperti sayap, hijau tapi berubah menjadi coklat ketika masak. Biji : kecil, terdapat alat tambahan yang berlekuk pada pangkal biji, coklat. Hasil deskripsi dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Hasil pengumpulan bahan, pengeringan, dan pembuatan serbuk daun singkong

Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) diperoleh dari salah satu kebun di daerah Boyolali, Jawa Tengah pada bulan Januari 2018. Tanaman daun singkong yang diambil memiliki daun yang masih muda, berwarna hijau, dan terbebas dari hama. Daun singkong yang telah dikumpulkan dibersihkan, dicuci dan dikeringkan. Pengeringan bahan dilakukan bertujuan untuk mengurangi kadar air serta mencegah tumbuhnya jamur dan mikroorganisme lain yang dapat menyebabkan pembusukan dan mencegah perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada tabel 1. Daun singkong sebanyak 10000 gram bobot basah kemudian dikeringkan dan didapat bobot kering 2460 gram, diperoleh rendemen bobot kering terhadap bobot basah adalah 24,6%. Perhitungan persentase bobot basah terhadap bobot kering dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun singkong

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (% b/b)
10000	2460	24,6

Simplisia yang telah kering dihaluskan dengan blender kemudian diayak dengan menggunakan ayakan no 40. Penyerbukan bertujuan untuk memperkecil ukuran serbuk, memperluas permukaan partikel sehingga pengekskresian dapat berlangsung dengan efektif.

3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun singkong

Penetapan kadar lembab daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menggunakan alat *Moisture Balance*. Hasil penetapannya tercantum pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan daun singkong

No	Bobot serbuk (gram)	Susut pengeringan (%)
1	2,01	4,5
2	2,02	4,5
3	2,02	4,9
Rata-rata		4,63

Hasil penetapan kadar lembab daun singkong didapatkan rata-rata sebesar 4,63%. Kadar lembab memenuhi syarat di mana kadar lembab serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10% karena dengan kadar lembab kurang dari 10% sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tidak tumbuh sehingga bahan lebih awet (Katno *et al.* 2008).

4. Hasil pembuatan ekstrak etanol 70% daun singkong

Pembuatan ekstrak etanol dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi, maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Keuntungan cara penyari dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Metode maserasi tidak menggunakan pemanasan sehingga komponen yang tidak tahan panas seperti flavonoid tetap ada di dalam ekstrak. Hasil pembuatan ekstrak kental maserasi daun singkong dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun singkong

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (% b/b)
500	134	26,8

Pada saat penyaringan didapatkan filtrat sebanyak 2 liter. kemudian ekstrak dikentalkan atau dipekatkan menggunakan rotary evaporator. Ekstrak kental yang didapat sebanyak 134 gram. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada proses pengekskresian daun singkong dari 500 gram serbuk dapat ditarik

senyawa berkhasiat sebanyak 134 gram. Berdasarkan hasil perhitungan diketahui bahwa rendemen hasil maserasi sebanyak 26,8%. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 11.

5. Hasil uji bebas etanol daun singkong

Hasil pengujian bebas etanol ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun singkong

Hasil	Pustaka
Tidak tercium bau ester	Tidak tercium bau ester (Kurniawati 2015)

Hasil uji ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) positif bebas etanol karena tidak tercium bau ester. Tujuan dilakukan uji bebas etanol pada ekstrak daun singkong adalah untuk mencegah kesalahan pengamatan dalam tahap penelitian selanjutnya yaitu pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 sebab etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian.

6. Fraksinasi ekstrak daun singkong

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawanya yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda.

Senyawa non polar akan terekstraksi dalam pelarut n-heksana, senyawa semipolar akan terekstraksi dalam pelarut etil asetat, dan senyawa polar akan terekstraksi dalam pelarut air. Bahan aktif yang sudah terekstraksi dalam masing-masing pelarut yang sesuai dengan kepolarannya akan mudah diperkirakan kandungan kimia yang dapat digunakan sebagai antibakteri (Mukhrani 2014; Tiwari et al. 2011). Rendemen hasil fraksinasi fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Rendemen hasil fraksinasi n-heksan, etil asetat, dan air daun singkong

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)			Rendemen (%)		
	n-Heksan	Etil asetat	Air	n-Heksan	Etil asetat a	Air
10,06	1,11	1,37	5,78	11,03	13,61	57,45
10,01	1,10	1,34	5,78	10,98	13,38	57,74
10,03	1,10	1,35	5,77	10,96	13,45	57,52
Rata-rata	1,10	1,35	5,77	10,99	13,48	57,57

Berdasarkan tabel 6 dapat diketahui bahwa perhitungan persentase rendemen fraksi n-heksana, etil asetat, dan air daun singkong yang diperoleh berturut-turut adalah 10,99%, 13,48%, dan 57,57%. Hasil perhitungan rendemen fraksi n-heksana etil asetat dan air daun turi dapat dilihat pada lampiran 12,13 dan 14.

Hasil fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibandingkan fraksi yang lain karena beberapa senyawa dalam daun singkong bersifat polar. Hasil dari proses fraksinasi dengan etil asetat lebih sedikit dibandingkan dengan fraksi air karena tidak semua senyawa terpisahkan dengan baik. Hasil fraksinasi n-heksan paling sedikit diantara fraksi lainnya karena senyawa non polar yang berada dalam daun singkong sangat sedikit. Rendemen setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) berbeda. Hasil rendemen yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu 100% atau mendekati 100%. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena ekstrak banyak yang menempel pada wadah dan corong pisah dan kurangnya kekentalan ekstrak untuk proses fraksinasi.

7. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun singkong

Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun singkong dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun singkong

Senyawa	Hasil	Pustaka	Ket
Flavonoid	Warna kuning pada lapisan amil alkohol.	Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah <i>et al.</i> 2014).	(+)
Saponin	Terbentuk busa yang stabil + 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang.	Terbentuk busa yang stabil + 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang (Ramyashree <i>et al.</i> 2012).	(+)
Tanin	Warna hijau kehitaman.	Terbentuk warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Ramyashree <i>et al.</i> 2012).	(+)

Hasil gambar identifikasi senyawa kimia ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dapat dilihat pada lampiran 5. Identifikasi kandungan kimia terhadap ekstrak daun singkong dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam daun singkong dengan menggunakan tabung reaksi.

Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat bahwa hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun singkong positif mengandung flavonoid, saponin, dan tanin yang diperkirakan mempunyai aktivitas antibakteri.

8. Identifikasi bakteri uji

8.1 Identifikasi secara makroskopis. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara makroskopis menunjukkan koloni berwarna merah dengan kilat logam, hal ini disebabkan *Escherichia coli* ATCC 25922 memetabolisme laktosa dan menghasilkan aldehyd dan asam. Aldehyd akan melepaskan fuksin dari senyawa fuksin-sulfat kemudian akan mewarnai koloni merah dan akan terlihat berwarna seperti kilat logam (Kartika *et al.* 2014). Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara makroskopis dapat dilihat pada lampiran 6.

8.2 Identifikasi bakteri secara mikroskopis dengan perwarnaan Gram. Pewarnaan dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa bakteri tersebut golongan bakteri *Escherichia coli*. Gram negatif didapatkan bila sel berwarna merah, bentuk cocobasil dan memiliki flagel berarti positif golongan *Escherichia coli*. Identifikasi mikroskopis dapat di lihat dalam lampiran 6.

8.3 Hasil identifikasi biokimia. Identifikasi uji biokimia pada *Escherichia coli* berdasar tabel 7 dan hasil identifikasi dapat dilihat dalam lampiran 7.

Tabel 7. Hasil identifikasi biokimia *Escherichia coli*

Pengujian	Hasil	Pustaka (Volk dan Wheller 1988)
SIM	-++	-++
KIA	A/AGS(-)	A/AGS(-)
LIA	K/KS(-)	K/KS(-)
Citrat	-	-

Keterangan :

SIM : *Sulfida Indol Agar*

KIA : *Kliger Iron Agar*

LIA : *Lysine Iron Agar*

A/A : kuning (pada media KIA)

G : terbentuk gas

K/K : terbentuk warna ungu (pada media LIA)

S(-) : tidak terbentuk warna hitam

Hasil pengujian pada media SIM (*Sulfida Indol Motility*) untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pengujian dengan media SIM setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C menunjukkan hasil -++. Pada uji sulfida *Escherichia coli* tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide sehingga media tidak berwarna hitam. Uji indol dengan

menambahkan tiga tetes Erlich A dan B bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri mereduksi enzim triptopanase yang ditandai dengan permukaan media berwarna merah muda, bakteri *Escherichia coli* positif membentuk indol. Uji motilitas positif ditunjukkan dengan penyebaran di media SIM.

Hasil pengujian pada media KIA (*Kliger Iron Agar*) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas, dan pembentukan sulfida. Pengujian dengan media KIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C menunjukkan hasil A/AGS (-), A/A artinya pada lereng dasar media berwarna kuning, hal ini menunjukkan bahwa bakteri memfermentasi glukosa dan laktosa, G artinya terbentuk gas yang ditandai dengan terangkatnya media, S(-) artinya H₂S negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media, karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S, dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam. Media KIA mengandung laktosa dan glukosa dalam konsentrasi 1% laktosa, 0,1% glukosa, dan phenol red sebagai indicator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam. Media KIA juga mengandung sodium thiosulfat yaitu susunan untuk penghasil H₂S.

Media LIA (*Lysin Iron Agar*) ntuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Pengujian dengan LIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C menunjukkan hasil K/KS(-). K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendeakarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) di seluruh media. S(-) artinya uji H₂S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA.

Hasil pengujian pada media *Citrat* untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian dengan media *Citrat* setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C menunjukkan hasil negatif sehingga warna media tetap hijau. Menunjukkan bahwa *Escherichia coli* tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Media *Citrat* terdapat indikator BTB (Bromo thymol blue) yang merupakan indikator pH, jika mikroba

mampu menggunakan citrat menyebabkan suasana basa, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru.

9. Hasil pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Escherichia coli* dalam biakan murni diambil masing-masing satu ose dan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 10 mL media BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian di vortex lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Suspensi yang telah diencerkan dibandingkan dengan larutan standar Mc Farland 0,5 sampai didapat kekeruhan yang sama. Pembuatan suspensi bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah bakteri.

10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun singkong.

10.1 Hasil pengujian antibakteri secara difusi. Hasil dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun singkong dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 menggunakan metode difusi dengan seri konsentrasi 50%, 25%, 12,5% dengan pembanding kontrol positif adalah kotrimoksazol dan kontrol negatif pelarut DMSO 5% untuk mengetahui fraksi paling aktif dengan melihat luas diameter daya hambat masing-masing fraksi.

Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi kemudian diukur diameter zona hambat sekitar cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Zona yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar kertas cakram menandakan bahwa kandungan kimia daun singkong memiliki daya hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Hasil diameter zona hambat dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksinasi daun singkong terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara difusi

Sampel	Konsentrasi (%)	Diameter hambat (mm)			
		Replikasi			Rata-rata
		1	2	3	
Ekstrak	50	12	12	13	12,33
	25	11	12	11	11,33
	12,5	10	10	10	10,00
n-Heksan	50	9	9	9	9,00
	25	8	9	8	8,33
	12,5	8	8	7	7,66
Fraksi etil asetat	50	20	20	19	19,66
	25	18	17	17	17,33
	12,5	16	15	16	15,66
Fraksi air	50	11	10	11	10,66
	25	10	10	9	9,66
	12,5	9	9	8	8,66
Kontrol positif (kotrimoksazol)	25 µg	24	24	24	24
Kontrol negatif (DMSO 5%)	5	0	0	0	0

Luas daerah hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 ditunjukkan dengan adanya daerah jernih disekitar cakram (disk) pada media MHA. Aktivitas antibakteri suatu senyawa dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain kandungan senyawa antibakteri, daya difusi ekstrak, jenis bakteri yang dihambat dan konsentrasi ekstrak. Semakin tinggi suatu konsentasi maka semakin banyak pula kandungan senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak, dan semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk.

Analisis data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi diuji secara statistik *Analisis of Varian (ANOVA) oneway*. *Analisis of Varian (ANOVA) oneway* digunakan untuk membandingkan fraksi pada tiap konsentrasi dan aktivitas antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat, dan air, ekstrak etanol, kontrol positif, kontrol negatif guna mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan. Hasil uji difusi *one-sample Kolmogorov* diperoleh hasil signifikan yaitu $0,136 > 0,05$ maka H_0 diterima, data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan *analisis of variansi (ANOVA) oneway* tabel diameter hambat diperoleh $F = 435,238$ dengan probabilitas $0,000 < 0,05$ yang berarti dari tiap sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *Escherichia coli* ATCC 25922. Pada tabel *Tukey HSD* terdapat tanda * pada *Mean*

Difference menunjukkan bahwa perbedaan diameter hambat aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Tabel *Homogenous Subset* bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogenous Subset* terbagi kedalam 10 subset. Pada subset 1 terdapat kontrol negatif yaitu DMSO 5%, pada subset 2 terdapat n-heksan 12,5% , n-heksan 25%, air 12,5%, dan n-heksan 50%, pada subset 3 terdapat n-heksan 25%, air 12,5%, n-heksan 50%, dan air 25%, pada subset 4 terdapat air 25%, air 50%, dan ekstrak 12,5% pada subset 5 terdapat air 50%, ekstrak 12,5%, dan ekstrak 25%, pada subset 6 terdapat ekstrak 12,5%, 25%, dan 50% pada subset 7 terdapat etil asetat 12,5%, pada subset 8 terdapat etil 25%, pada subset 9 terdapat etil 50%, pada subset 10 terdapat kontrol positif kotrimoksazol dengan konsentrasi 25 µg. Berdasarkan berbagai subset diketahui bahwa semakin ke kanan maka semakin besar diameter hambatnya. Diameter hambat subset 1-10 diketahui mempunyai perberbedaan aktivitas antibakteri. Hasil analisis data statistik dapat dilihat pada lampiran 15.

Berdasarkan tabel 8 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki daya hambat paling besar terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dibandingkan ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan air, karena fraksi etil asetat mampu menarik senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun singkong seperti flavonoid, saponin, dan tanin yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Ekstrak etanol mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun singkong, tetapi senyawa tersebut tidak dapat bekerja secara optimum sehingga daya hambatnya lebih kecil setelah fraksi etil. Fraksi air memiliki daya hambat yang lebih kecil setelah ekstrak daun singkong hal tersebut dikarenakan fraksi air dapat menarik semua senyawa baik senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri maupun senyawa yang tidak memiliki aktivitas antibakteri. Namun fraksi air merupakan hasil residu dari fraksi etil, jadi kemungkinan senyawa-senyawa antibakteri lebih banyak terlarut dalam fraksi etil asetat. Berdasarkan hasil uji tabung fraksi air hanya dapat menarik senyawa flavonoid saja sebagai antibakteri sedangkan saponin dan tannin tidak terdapat pada fraksi air. Fraksi n-heksan memiliki diameter zona hambat paling rendah dibanding fraksi yang lain hal ini

kemungkinan dikarenakan senyawa-senyawa yang tertarik oleh *n*-heksan memiliki aktivitas antibakteri yang sangat rendah. Perbedaan diameter zona hambat tiap fraksi dikarenakan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun singkong memiliki kepolaran yang berbeda, sehingga senyawa yang tertarik oleh fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air berbeda pula sesuai tingkat kepolaran masing-masing. Hal ini dibuktikan pada identifikasi senyawa kimia dengan uji tabung yaitu flavonoid, saponin, dan tannin.

Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Dewanti & Wahyudi 2011). Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah melibatkan pembentukan kompleks dengan sterol pada membran plasma sehingga menghancurkan semi permeabilitas sel, kemudian mengarah pada kematian sel (Kumalasari dan Sulistyani 2011). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri dengan mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri (Juliantina *et al* 2014).

Pada pelarut DMSO 5% menunjukkan bahwa tidak terdapatnya zona hambat disekitar cakram disk, hal tersebut membuktikan bahwa pelarut tersebut tidak memiliki aktivitas antibakteri. Pelarut DMSO 5% digunakan sebagai kontrol negatif. Pada kontrol positif (kotrimoksazol) menunjukkan zona hambat paling besar dimana masuk dalam kategori kuat dibandingkan dengan fraksi etil esatad yang masuk dalam kategori sedang, hal tersebut dikarenakan kotrimoksazol merupakan suatu bahan kimia yang telah terbukti dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil uji antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 15.

10.2 Hasil pengujian antibakteri daun singkong secara dilusi.

Tabel 9. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun singkong terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922

No.	Konsentrasi (% b/v)	Fraksi Etil Asetat		
		I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	50	-	-	-
3	25	-	-	-
4	12,5	-	-	-
5	6,25	+	+	+
6	3,12	+	+	+
7	1,56	+	+	+
8	0,78	+	+	+
9	0,39	+	+	+
10	0,19	+	+	+
11	0,09	+	+	+
12	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :

(-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : Ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-) : Larutan stok (fraksi)

Kontrol (+) : Suspensi bakteri

Tabung no. 2-11 : Larutan uji dan suspensi bakteri

Hasil fraksi etil asetat daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Seri konsentrasi yang dibuat adalah 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09% dengan kontrol positif berupa bakteri uji dalam media BHI dan kontrol negatif berupa fraksi etil asetat. Hasil gambar uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara dilusi dapat dilihat pada lampiran 10. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat dilihat dari kejernihan tabung yang menunjukkan bahwa pada tabung konsentrasi tertentu dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Konsentrasi Hambat Minimum terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 tidak bisa dilihat dari kejernihannya karena ditutupi oleh kekeruhan dari bagian fraksi yang digunakan. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menunjukkan adanya daya antibakteri fraksi yang dapat dilihat dari pengujian fraksi terhadap bakteri uji pada tabung kemudian diinokulasikan pada media Endo Agar dengan tidak atau adanya pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media Endo Agar.

Tabel 9 dapat dilihat bahwa Konsentrasi Bunuh Minimum fraksi etil asetat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah 12,5%. Hasil uji dilusi menunjukkan bahwa konsentrasi 12,5% tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada

replikasi pertama, kedua, dan ketiga. Pertumbuhan bakteri ditemukan pada konsentrasi 6,25% pada replikasi pertama, kedua, dan ketiga sehingga dapat disimpulkan Konsentrasi Bunuh Minimum fraksi etil asetat adalah 12,5%. Hasil uji antibakteri secara dilusi dapat dilihat pada lampiran 16.

BAB V

KESIMPILAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, fraksi etil asetat merupakan fraksi paling aktif dari ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) sebagai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 yaitu pada konsentrasi 12,5%

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) sebagai antibakteri pada bakteri gram negatif yang lain selain *Escherichia coli* 25922.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk dibuat sediaan yang dapat dikonsumsi masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurrahman D. 2008. *Biologi Kelompok Pertanian dan Kesehatan*. Bandung: Grafindo Media Pratama
- Adi & Lukas T. 2006. *Tanaman Obat dan Jus Untuk Asam Urat dan Rematik*. PT Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Alamsyah HK, Widowati I, Sabdono A. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *Sargassum cinereum* (J.G. Agardh) dari perairan pulau panjang Jepara terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermidis*. *Journal Of Marine Research* 3:69-78.
- Al-Rubiay KK, Jaber NN, Al-Mhaawe BH, & Alrubaiy LK. 2008. Antimicrobial Efficacy of Henna Extracts. *Oman Medical Journal*. 23 (4): 253-256
- Anief M. 2003. *Ilmu Meracik Obat, Teori dan Praktek*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. hlm 168-169.
- Arifianti L, Oktarina RD, Kusumawati I. 2014. Pengaruh jenis pelarut pengekstraksi terhadap kadar sinensetin dalam ekstrak daun *Orthosiphon stamineus* Benth. *E-Journal Planta Husada* 2:1-4.
- Aulia RN. 2013. Uji Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) terhadap Jumlah Neutrofil pada Proses Penyembuhan Luka Tikus (*Rattus norvegicus*). Universitas Jember: Fakultas Kedokteran Gigi.
- Ayu C. (2002) Mempelajari Kadar Mineral dan Logam Berat pada Komoditi Sayuran Segar Beberapa Pasar Di Bogor. Skripsi, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB. Dalam: Nengsih, RF. (2012) Pengaruh Cara Dan Suhu Pengolahan Terhadap Kandungan Kalsium Pada Daun Singkong (*Manihot utilisima*) Tumbuk. Skripsi, Universitas Negeri Medan
- Bonang G dan Koeswardono.1982. *Mikrobiologi Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: PT Gramedia. hlm 77-78, 176-191.
- Carter GR, wise DJ. 2004. *Essential of Veterinary Bacteriology and Mycology* 6. Ed. Iowi: Blackwell Publishing.
- Cielsa WP, Guerrant RL, 2003. *Infectious Diarrhoea*. In: Wilson WR, Drew WL., Henry NK.
- Dalimartha S. 2008. *1001 Resep Herbal*. Jakarta: Penebar Swadaya . Hlmn 11-12
- Defrin DP, Santun BR, Lelly Y. 2010. Efek antidiare ekstrak air umbi sarang semut (*Mymecodia pendens*) pada mencit putih (*Mus musculus*). *Prosiding SnaPP edisi Eksakta* 2: 54-71

- Deinstrop dan Elke. 2007. *Applied Thin-Layer Chromatography*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCA. hlm 1-2.
- Dewanti S dan Wahyudi MT. 2011. Antibacterial activity of bay leaf infuse (Folia *Syzygium polyanthum* Wight) to *Escherichia coli* in-vitro. Faculty of medicine. Airlangga University. *Jurnal Medika Planta* 1:78-81.
- [Depkes RI]. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 6-7, 10-12.
- [DepKes RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Edisi I. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. Jakarta.
- Denyer SP, Norman AH, Sean PG. 2004. *Pharmaceutical Mikrobiology*. 7th. Victoria. Australia: Blackwell. Science. hlmn: 346-363.
- Ganiswara, S. (2007). *Obat Otonom*. Dalam Farmakologi dan Terapi ed.5. editor: Sulistia Ganiswara. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Hal: 36,56,57
- Gunawan D dan Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam*. Jilid I. Jakarta: Penebar Swadaya. hlm 9-13.
- Gunawan SG, Setiabudy R, Nafrialdi, Elysabeth, editor. 2009. *Farmakologi dan Terapi*. Ed ke 5. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI. hlm 585-587, 605-608
- Handa SS, Suman PSK, Gennaro L, Dev DR. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: ICS-UNIDO.
- Harborne JB. 2007. Metode Fitokimia: *Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Ed ke-4. penerjemah; Padmawinata K, Soediro I. Bandung: Penerbit ITB Press.
- Hariana, Arief. 2006. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya Seri 3*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hayati KE, Fasyah AG, Sa'adah L. 2010. Fraksinasi dan identifikasi senyawa taninpada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Journal of Chemistry* 4:195
- Hidayat N. 2012 Uji Aktivitas Anti Bakteri Fraksi *n*-Heksan, Etil Asetat, dan Air dari Ekstrak Etanolik Batang Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* A.) terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Skripsi. Universitas Setia Budi Surakarta

- Jayanegara A; Sofian A, 2008, *Penentuan Aktivitas Biologi Tanin beberapa Hijauan secara in vitro menggunakan 'Hohenheim Gas Test' dengan Polietilonglikol secara Dertiman*, jurnal Media Peternakan 31: 44-52
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 25. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari : Medical Microbiology.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2007. *Medical Mikrobiologi* 2thEd. The McGraw Hill Compaines, USA.
- Kairupan PC, Fatimawati, Widya AL. 2014. Uji daya hambat ekstrak etanol daun kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi* 3: 93-98
- Katno, Kusumadewi AW, Sutjipto. 2008. Pengaruh waktu pengeringan terhadap kadar tanin daun jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.). *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia* 1: 38-46.
- Kumalasari E, Sulistyani N. 2011. Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Batang Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen.) terhadap *Candida albicans* serta skrining fitokimia. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 1(2): 51-62, 59-60
- Kurniawati E. 2015. Daya antibakteri ekstrak etanol tunas bambu apus terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Jurnal Wiyata* 2: 83-90.
- Madduluri S, Rao BK, Tamran SB. 2013. In Vitro Evaluation of Antibacterial Activity of Five Indigenous Plants Extract Againsts Five Bacterial Pathogens of Human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*.
- Maksum R. 2002. *Buku Ajar Mikrobiologi*. Jakarta: penerbit buku kedokteran EGC. Hlm: 125-129.
- Melliawati. R. 2009. *E. coli* dalam kehidupan manusia. *Bio trends/Vol.4/No.1/Th.2009*.
- Miladiyah I, Dayi F, Desrini S. 2011. Analgesic Activity of Ethanolic Extract of *Manihot esculenta* Crantz Leaves in Mice. *Universa Medicina* 30(1): 3-10.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan* 7:361-367.
- Mutia C, Fitriyaningsih SP, Choersina R. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap Bakteri

Escherichia coli dan *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Prosiding Farmasi* 3(1):14-19

- Nurainy F, Rizal S, Yudiantoro. 2008. Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar (sumur). Universitas Diponegoro. Semarang. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian* 13:117-125.
- Oei GD. 2008. *Terapi Mata Dengan Pijat dan Ramuan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Permatasari D, Pitopang R, Anam S, Ivan. 2015. Uji daya hambat ekstrak batang tumbuhan *Harrisonia Perforata* Merr. terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella Dysenteriae*. *Biocelbes* 9:1-7.
- Pratiwi, ST. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta. Penerbit Erlangga. Hal: 136-190.
- Prasetyo H. 2012. Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Fraksi Semipolar Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*. [Skripsi]. Universitas Muhammadiyah Surakarta: Fakultas Farmasi.
- Procop GW, Cockreril F. 2003. Enteritis Caused by *Escherichia coli* and *Shigella* and *Salmonella* Species. Di dalam: Wilson WR, Drew WL, Henry NK, et al, Editor. *Current Diagnosis and Treatment in Infection Disease*. New York: Lange Medical Books, hlm 584-660
- Purwono, H. Purnamawati. 2007. *Budidaya 8 Jenis Tanaman Pangan Unggul*. Jakarta: Penebar Swadaya. 137 hal.
- Purwono. 2009. *Budidaya 8 Jenis Tanaman Unggul*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Putri WS, Warditiani NK, Larasanty LPF. 2013. Skrining fitokimia ekstrak etil asetat kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) Bali: Universitas Udayana. hlm 56-60.
- Rahmawati I, Samsumaharto RA, W Iryanto EZ. 2015. Uji aktivitas Antibakteri Fraksi n-heksan, Kloroform dan Air dari Ekstrak Etanolik Daun Zodia (*Evodia sauveolens*, Scheff.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi. Surakarta
- Ramyashree M, Krishna Ram H, Shivabasavaiah. 2012. Ethnomedicinal value of opuntia elatior fruits and its effects in mice. University of Mysore. Karnataka. India. *Journal of Pharmacy Research* 8: 4554-4558.

- Ravikumar S, Syed A, Ramu A, Ferosekhan M. 2011. Antibacterial activity of chosen mangrove plants against bacterial specified pathogens. *World Applied Sciences Journal* 14: 1198- 1202.
- Richardo, 2012. *Kandungan Organik Tanaman Singkong*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Rukmana, Rahmat. 2002. *Budi Daya Tanaman Singkong*. Kaninus: Yogyakarta.
- Sari YD, Sitti ND, Laela HN, 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Secara In Vitro terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 35218 serta Profil Farmakologi Lapis Tipis. *Journal Kesmas ISSN* 1978-0575: 218-238
- Sintia dan Murhananto. 2004. *Memfaatkan Tanaman Sayur Untuk Mengatasi Aneka Penyakit*. PT Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Sri Harti. 2016. *Mikrobiologi Kesehatan*. Yogyakarta. Penerbit: Andi. Hal: 186-193
- Sukandar Elin Y. 2013. *ISO Farmakoterapi Buku 1*. Jakarta: ISFI penerbitan. Hlmn: 741-743
- Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Gramedia. hlmn: 42-44
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. 2011. Phytochemical screening and extractoin. *Internationale Pharmaceutica Sciecia* 1:98-106.
- Tjay TH dan Rahardja K. 2002. *Obat-obat Penting*. Edisi I. Jakarta: Depkes. hlm 195-203.
- Tjitrosoepomo. 2005. Pemanfaatan Bagian Tanaman Singkong. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol 8: 1-15.
- Volk WA. Dan Wheeler MF. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi 5. Markham, penerjemah; Adisoemarto S, editor. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: Basic Microbiology. hlm 331-335.
- Wardhani LK dan Sulistyani N. 2012. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* beserta profil Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 2:1-16.
- WHO. 2005. *The Treatment of Diarrhoea: a Manual for Physicians and Other Senior Health Workers*, 4th rev., World Healt Organization, Geneva

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

Lampiran 1. Determinasi daun singkong



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

Nomor : 64/UN27.9.6.4/Lab/2018
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -

Nama Pemesan : Suryani
NIM : 20144269A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Manihot esculenta* Crantz
Synonym : *Manihot utilissima* Pohl.
Familia : Euphorbiaceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963) :
1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73a 99. Euphorbiaceae
1b-3b-4b-6b-57b-73b-80b-81b-84b-85a-86b-87b-88a-89a 48. *Manihot*
1a *Manihot esculenta* Crantz

Deskripsi Tumbuhan :

Habitat : perdu, menahun, tumbuh tegak, bergetah, tinggi 2-7 m. Akar : tunggang, kalau diperbanyak dengan stek akan membentuk akar serabut yang kemudian berkembang menjadi umbi akar, umbi akar besar, panjang, kulit berwarna coklat suram, daging umbi berwarna putih hingga kuning. Batang : bulat, berkayu, sedikit bercabang atau tidak bercabang sama sekali, di bagian tengah terdapat jaringan gabus, di permukaan batang terdapat bekas dudukan tangkai daun yang bertonjolan, licin dan gundul, putih kotor. Daun : tunggal, tersusun berseling; bentuk helaian daun bulat, diameter 5-20 cm, pangkal tumpul hingga membulat, tepi berbagi menjari dengan 5-9 cangap, cangapnya berbentuk bulat telur memanjang hingga menggaris-lanset, ujung cangap runcing, lebar 1- 6 cm, ujung helaian daun membulat, pertulangan menjari, permukaan atas hijau tua dan permukaan bawah hijau muda, licin dan gundul; tangkai daun bulat, hijau hingga hijau kemerahan, licin dan gundul, panjang 6-35 cm; daun penumpu sepasang, dekat pangkat tangkai daun, berlepasan, ujungnya rata, mudah rontok. Bunga : majemuk tipe tandan, 3-5 tandan berkumpul di ujung batang, pada bagian pangkal terdapat bunga betina, di bagian atas terdapat bunga jantan, panjang tenda bunga 1 cm. Bunga jantan : panjang tangkai bunga 4-6 mm, tenda bunga berbentuk lonceng, bertaju 5, benangsari 10, berseling panjang dan pendek, tertancap di sekitar penebalan dasar bunga yang kuning dan berlekuk. Bunga betina : panjang tangkai bunga 1.5-2.5 cm, kelopak bunga lebih besar daripada bunga jantan, tenda bunga berbagi 5, bakal buah dikelilingi oleh tonjolan penebalan dasar bunga yang berbentuk cincin, kuning, tangkai putik bersatu, sangat pendek, dengan kepala putik yang lebar berwarna kuning mentega dan berlekuk banyak. Buah : berbentuk seperti bola atau telur, dengan 6 papan yang membujur seperti sayap, hijau tapi berubah menjadi coklat ketika masak. Biji : kecil, terdapat alat tambahan yang berlekuk pada pangkal biji, coklat.

Surakarta, 26 Maret 2018

Penanggungjawab
Determinasi Tumbuhan

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

Kepala Lab/ Program Studi Biologi

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



Lampiran 2. Foto daun dan serbuk daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

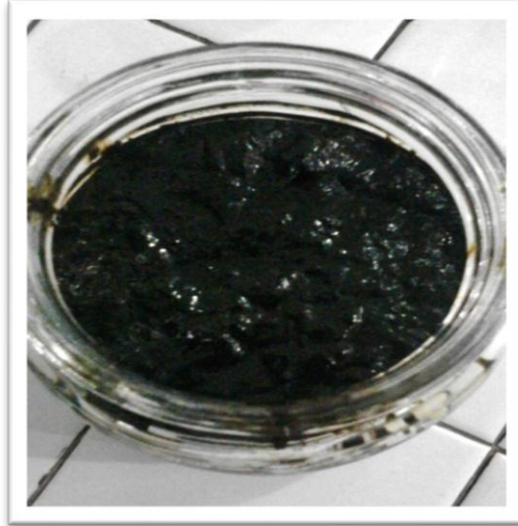


Gambar 6. Foto daun singkong



Gambar 7. Foto serbuk daun singkong

Lampiran 3. Foto ekstrak dan fraksinasi daun singkong



Gambar 8. Foto ekstrak Daun singkong









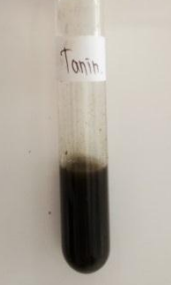





Gambar 9. Foto Fraksinasi

Lampiran 4. Alat penelitian**Gambar 10. Alat *moisture balance*****Gambar 11. Oven binder****Gambar 12. Rotary evaporator****Gambar 13. Autovortex**

Lampiran 5. Foto hasil uji bebas etanol dan identifikasi kandungan kimia ekstrak daun singkong

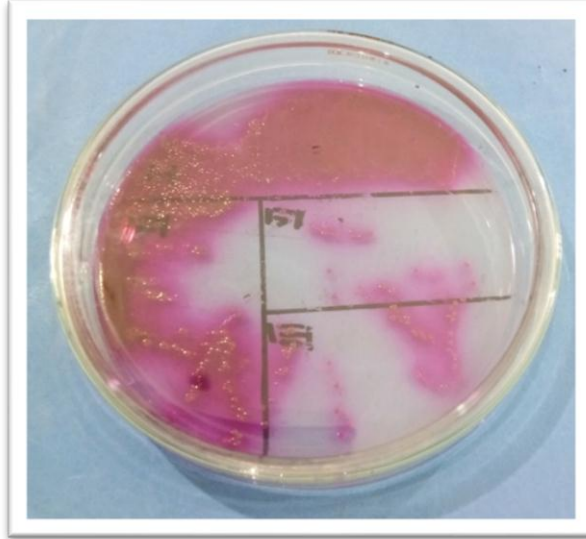


Gambar 14. Foto hasil uji bebas etanol

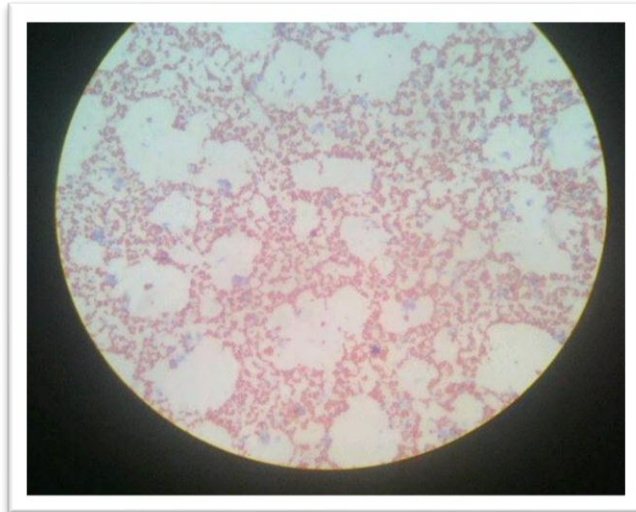
Senyawa	Hasil			
	Ekstrak	Fraksi n-heksan	Fraksi etil asetat	Fraksi air
Saponin				
Tanin				
Flavonoid				

Gambar 15. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun singkong

Lampiran 6. Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara makroskopis dan mikroskopis

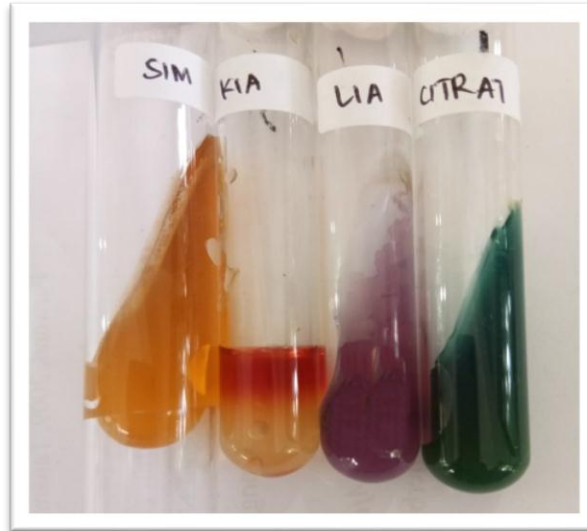


Gambar 16. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara makroskopis



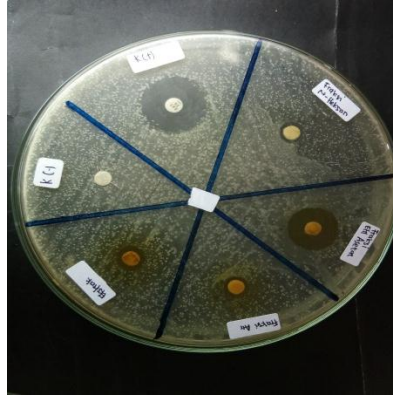
Gambar 17. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara mikroskopis

Lampiran 7. Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara biokimia

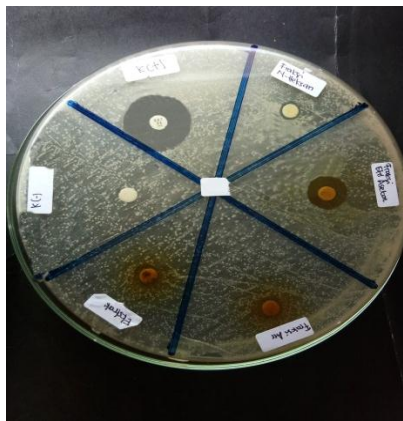


Gambar 18. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara biokimia

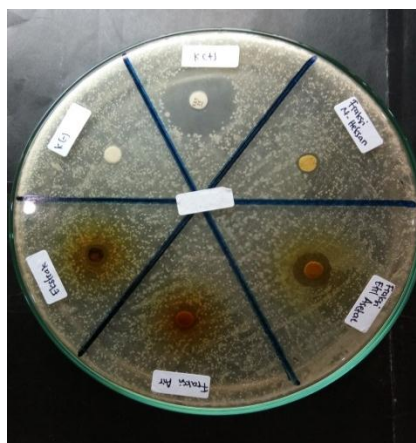
Lampiran 8. Hasil uji antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara difusi



Gambar 20. Hasil difusi konsentrasi 50%



Gambar 21. Hasil difusi konsentrasi 25%



Gambar 22. Hasil difusi konsentrasi 12,5%

Lampiran 9. Hasil uji antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara dilusi



Gambar 23. Hasil dilusi

Lampiran 10. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (% b/b)
10000	2460	24,60

Perhitungan bobot kering terhadap bobot basah adalah:

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

$$\% \text{ Bobot kering} = \frac{2460 \text{ (g)}}{10000 \text{ (g)}} \times 100\% = 24,60\%$$

Maka persentase bobot kering terhadap bobot basah adalah 24,60 %.

**Lampiran 11. Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun singkong
(*Manihot esculenta* Crantz)**

Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun singkong

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (% b/b)
500	134	26,8

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

$$= \frac{134 \text{ g}}{500 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 26,8 \%$$

Lampiran 12. Perhitungan rendemen fraksi *n*-heksan dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

Tabel Rendemen hasil fraksinasi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun singkong

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)			Rendemen (%)		
	n-Heksan	Etil asetat	Air	n-Heksan	Etil asetat a	Air
10,06	1,11	1,37	5,78	11,03	13,61	57,45
10,01	1,10	1,34	5,78	10,98	13,38	57,74
10,03	1,10	1,35	5,77	10,96	13,45	57,52
Rata-rata	1,10	1,35	5,77	10,99	13,48	57,57

$$\text{Rendemen fraksi } n\text{-heksan} = \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen I} = \frac{1,11 \text{ g}}{10,06 \text{ g}} \times 100\% = 11,03 \%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{1,10 \text{ g}}{10,01 \text{ g}} \times 100\% = 10,98 \%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{1,10 \text{ g}}{10,03 \text{ g}} \times 100\% = 10,96 \%$$

Lampiran 13. Perhitungan rendemen fraksi etil asetat dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

Tabel Rendemen hasil fraksinasi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun singkong

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)			Rendemen (%)		
	n-Heksan	Etil asetat	Air	n-Heksan	Etil asetat a	Air
10,06	1,11	1,37	5,78	11,03	13,61	57,45
10,01	1,10	1,34	5,78	10,98	13,38	57,74
10,03	1,10	1,35	5,77	10,96	13,45	57,52
Rata-rata	1,10	1,35	5,77	10,99	13,48	57,57

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

$$\% \text{ Rendemen I} = \frac{1,37 \text{ g}}{10,06 \text{ g}} \times 100\% = 13,61\%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{1,34 \text{ g}}{10,01 \text{ g}} \times 100\% = 13,38\%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{1,35 \text{ g}}{10,03 \text{ g}} \times 100\% = 13,45\%$$

**Lampiran 14. Perhitungan rendemen fraksi air dari daun singkong
(*Manihot esculenta* Crantz)**

Tabel Rendemen hasil fraksinasi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun singkong

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)			Rendemen (%)		
	n-Heksan	Etil asetat	Air	n-Heksan	Etil asetat a	Air
10,06	1,11	1,37	5,78	11,03	13,61	57,45
10,01	1,10	1,34	5,78	10,98	13,38	57,74
10,03	1,10	1,35	5,77	10,96	13,45	57,52
Rata-rata	1,10	1,35	5,77	10,99	13,48	57,57

$$\text{Rendemen fraksi } n\text{-heksan} = \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen I} = \frac{5,78 \text{ g}}{10,06 \text{ g}} \times 100\% = 57,45\%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{5,78 \text{ g}}{10,01 \text{ g}} \times 100\% = 57,74\%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{5,77 \text{ g}}{10,03 \text{ g}} \times 100\% = 57,52\%$$

Lampiran 15. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi n-heksan, etil asetat, dan air pada metode difusi

1. Pembuatan konsentrasi 50%

$$50\% = \frac{50 \text{ g}}{100\text{ml}}$$

$$= \frac{0,5 \text{ g}}{1\text{ml}} = \frac{1 \text{ gr}}{2 \text{ ml}}$$

Menimbang 1 gram ekstrak etanolik atau fraksi kemudian masing-masing ditambahkan DMSO 5% sampai volume 2 ml.

2. Pembuatan konsentrasi 50%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1.50\% = 2\text{ml}.25\%$$

$$V_1 = \frac{2\text{ml}.25\%}{50\%}$$

$$= 1 \text{ ml}$$

Dipipet 1 ml sediaan awal 50% kemudian ditambah DMSO 5% sampai volume 2 ml.

3. Pembuatan konsentrasi 12,5%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1.25\% = 2\text{ml}.12,5\%$$

$$V_1 = \frac{2\text{ml}.12,5\%}{25\%}$$

$$= 1 \text{ ml}$$

Dipipet 1 ml sediaan awal 25% kemudian ditambah DMSO 5% sampai volume 2 ml

Lampiran 16. Pembuatan larutan stok dengan berbagai konsentrasi pada metode dilusi

Membuat larutan stok fraksi teraktif (etil asetat)

Larutan stok 50% = %b/v = 50g/100ml

Konsentrasi 50% = 2g/4ml

Ditimbang 2 gram fraksi etil asetat kemudian dimasukkan kedalam vial dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 4ml

Tabung reaksi 3 sampai 11 diisi BHI masing-masing 1 ml

Tabung 1 berisi kontrol negatif (larutan stok fraksi teraktif)

Dipipet 2 ml larutan stok fraksi teraktif

Tabung 2 berisi konsentrasi 50%

Dipipet 1 ml dari larutan stok fraksi teraktif

Tabung 3 berisi konsentrasi 25%

Dipipet 1 ml dari larutan stok fraksi teraktif dimasukkan kedalam tabung reaksi 3 yang telah berisi BHI 1ml.

Tabung 4 berisi konsentrasi 12,5%

$$V.C(25\%) = V(2ml). C(12,5\%)$$

$$V = 1ml$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (25%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 4 yang telah berisi BHI 1ml.

Tabung 5 berisi konsentrasi 6,255%

$$V.C(12,5\%) = V(2ml). C(6,25\%)$$

$$V = 1ml$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (12,5%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 5 yang telah berisi BHI 1ml.

Tabung 6 berisi konsentrasi 3,125%

$$V.C(6,25\%) = V(2ml). C(3,125\%)$$

$$V = 1ml$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (6,25%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 6 yang telah berisi BHI 1ml.

Tabung 7 berisi konsentrasi 1,563%

$$V.C(3,125\%) = V(2\text{ml}). C(1,563\%)$$

$$V = 1\text{ml}$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (3,125%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 7 yang telah berisi BHI 1ml.

Tabung 8 berisi konsentrasi 0,781%

$$V.C(1,563\%) = V(2\text{ml}). C(0,781\%)$$

$$V = 1\text{ml}$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (1,563) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 8 yang telah berisi BHI 1ml.

Tabung 9 berisi konsentrasi 0,391%

$$V.C(0,781\%) = V(2\text{ml}). C(0,391\%)$$

$$V = 1\text{ml}$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (0,781%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 9 yang telah berisi BHI 1ml.

Tabung 10 berisi konsentrasi 0,196%

$$V.C(0,391\%) = V(2\text{ml}). C(0,196\%)$$

$$V = 1\text{ml}$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (0,391%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 10 yang telah berisi BHI 1ml.

Tabung 11 berisi konsentrasi 0,098%

$$V.C(0,196\%) = V(2\text{ml}). C(0,098\%)$$

$$V = 1\text{ml}$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (0,196%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 11 yang telah berisi BHI 1ml.

Dipipet dari tabung 11 sebanyak 1 ml kemudian dibuang.

Dari tabung reaksi 2 sampai tabung reaksi 11 masing-masing dimasukkan 1 ml suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabung 12 berisi control positif yaitu suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 sebanyak 1 ml

Lampiran 17. Formulasi dan pembuatan media

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

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

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam Aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4 (Rhodehamel 1992).

2. Formulasi dan pembuatan Mueller Hinton Agar (MHA)

Beef, dehydrated infusion from	300,0 gram
Casein hydrolysate	17,5 gram
Starch	1,5 gram
Agar-agar	17,0 gram
Aquadestilata ad	1000 mL

Semua bahan dilarutkan dalam aquadestilata sampai 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

3. Formulasi dan pembuatan Endo Agar

Pepton from maeat	10,0 gram
Di potassium hydrogen fosfat	3,5 gram
Laktosa	10,0 gram
Sodium sulfit	2,5 gram
Fuchsin	0,4 gram
Agar – agar	12,5 gram
pH 7,4	

Reagen – reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1 L, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰ C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri.

4. Sulfida indol motility (SIM)

Pepton from casein	20 g
Pepton from meat	6 g
Ammonium Iron (II) citrate	0,2 g
Sodium thiosulfate	0,2 g
Agar-agar	0,2 g
Aquadest	ad 1000 ml, pH = 7,4

Bahan- bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

5. Klinger Iron Agar (KIA)

Pepton from casein	15 g
Pepton from meat	5 g
Ammonium Iron (II) citrate	0,5 g
Meat extract	3 g
Yeast extract	3 g
Sodium chloride	5 g
Laktosa	10 g
Glukosa	1 g
Sodium thiosulfate	0,5 g
Phenol red	0,024 g
Agar-agar	12 g
Aquadest	ad 1000 ml, pH = 7,4

Bahan- bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

6. Lysine Iron Agar (LIA)

Pepton from casein	5 g
Yeast extract	3 g
Glukosa	1 g
Lysine monohydrochloride	10 g
Sodium thiosulfate	0,04
Ammonium Iron (II) citrate	0,5 g
Bromo cresol purple	0,02 g
Agar-agar	12,5 g
Aquadest	ad 1000 ml, pH = 7,4

Bahan- bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

7. Citrat Agar

Ammonium hydrogen fosfat	1 g
DI- potassium hydrogen fosfate	1g
Sodium chloride	5 g
Magnesium sulfat	0,2 g
Bromo thymol blue	0,08 g
Agar-agar	12,5 g

Aquadest ad 1000 ml, pH = 7,4

Bahan- bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

Lampiran 18. Statistik

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		konsentrasi	diameter
N		42	42
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	7.50	11.833
	Std. Deviation	4.080	5.7463
Most Extreme Differences	Absolute	.090	.179
	Positive	.090	.179
	Negative	-.090	-.157
Kolmogorov-Smirnov Z		.585	1.159
Asymp. Sig. (2-tailed)		.884	.136

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

ANOVA

Diameter

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1347.167	13	103.628	435.238	.000
Within Groups	6.667	28	.238		
Total	1353.833	41			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable:diameter

	(I) konsentrasi	(J) konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	n-heksan 50%	n-heksan 25%	.6667	.3984	.909	-.792	2.125
		n-heksan 12,5%	1.3333	.3984	.099	-.125	2.792
		etil asetat 50%	-10.6667	.3984	.000	-12.125	-9.208
		etil asetat 25%	-8.3333	.3984	.000	-9.792	-6.875
		etil asetat 12,5%	-6.6667	.3984	.000	-8.125	-5.208
		air 50%	-1.6667	.3984	.015	-3.125	-.208
		air 25%	-.6667	.3984	.909	-2.125	.792
		air 12,5%	.3333	.3984	1.000	-1.125	1.792
		ekstrak 50%	-3.3333	.3984	.000	-4.792	-1.875
		ekstrak 25%	-2.6667	.3984	.000	-4.125	-1.208
		ekstrak 12,5%	-2.0000	.3984	.002	-3.458	-.542
		kontrol positif (kotrimoksazol)	-15.0000	.3984	.000	-16.458	-13.542
		kontrol negatif (DMSO 5%)	9.0000	.3984	.000	7.542	10.458
			n-heksan 25%	n-heksan 50%	-.6667	.3984	.909
		n-heksan 12,5%	.6667	.3984	.909	-.792	2.125
		etil asetat 50%	-11.3333	.3984	.000	-12.792	-9.875
		etil asetat 25%	-9.0000	.3984	.000	-10.458	-7.542
		etil asetat 12,5%	-7.3333	.3984	.000	-8.792	-5.875
		air 50%	-2.3333	.3984	.000	-3.792	-.875

	air 25%	-1.3333	.3984	.099	-2.792	.125
	air 12,5%	-.3333	.3984	1.000	-1.792	1.125
	ekstrak 50%	-4.0000	.3984	.000	-5.458	-2.542
	ekstrak 25%	-3.3333	.3984	.000	-4.792	-1.875
	ekstrak 12,5%	-2.6667	.3984	.000	-4.125	-1.208
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-15.6667	.3984	.000	-17.125	-14.208
	kontrol negatif (DMSO 5%)	8.3333	.3984	.000	6.875	9.792
n-heksan 12,5%	n-heksan 50%	-1.3333	.3984	.099	-2.792	.125
	n-heksan 25%	-.6667	.3984	.909	-2.125	.792
	etil asetat 50%	-12.0000	.3984	.000	-13.458	-10.542
	etil asetat 25%	-9.6667	.3984	.000	-11.125	-8.208
	etil asetat 12,5%	-8.0000	.3984	.000	-9.458	-6.542
	air 50%	-3.0000	.3984	.000	-4.458	-1.542
	air 25%	-2.0000	.3984	.002	-3.458	-.542
	air 12,5%	-1.0000	.3984	.436	-2.458	.458
	ekstrak 50%	-4.6667	.3984	.000	-6.125	-3.208
	ekstrak 25%	-4.0000	.3984	.000	-5.458	-2.542
	ekstrak 12,5%	-3.3333	.3984	.000	-4.792	-1.875
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-16.3333	.3984	.000	-17.792	-14.875
	kontrol negatif (DMSO 5%)	7.6667	.3984	.000	6.208	9.125
etil asetat 50%	n-heksan 50%	10.6667	.3984	.000	9.208	12.125
	n-heksan 25%	11.3333	.3984	.000	9.875	12.792
	n-heksan 12,5%	12.0000	.3984	.000	10.542	13.458
	etil asetat 25%	2.3333	.3984	.000	.875	3.792
	etil asetat 12,5%	4.0000	.3984	.000	2.542	5.458
	air 50%	9.0000	.3984	.000	7.542	10.458
	air 25%	10.0000	.3984	.000	8.542	11.458
	air 12,5%	11.0000	.3984	.000	9.542	12.458
	ekstrak 50%	7.3333	.3984	.000	5.875	8.792
	ekstrak 25%	8.0000	.3984	.000	6.542	9.458
	ekstrak 12,5%	8.6667	.3984	.000	7.208	10.125
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-4.3333	.3984	.000	-5.792	-2.875
	kontrol negatif (DMSO 5%)	19.6667	.3984	.000	18.208	21.125
etil asetat 25%	n-heksan 50%	8.3333	.3984	.000	6.875	9.792
	n-heksan 25%	9.0000	.3984	.000	7.542	10.458
	n-heksan 12,5%	9.6667	.3984	.000	8.208	11.125
	etil asetat 50%	-2.3333	.3984	.000	-3.792	-.875
	etil asetat 12,5%	1.6667	.3984	.015	.208	3.125
	air 50%	6.6667	.3984	.000	5.208	8.125
	air 25%	7.6667	.3984	.000	6.208	9.125
	air 12,5%	8.6667	.3984	.000	7.208	10.125
	ekstrak 50%	5.0000	.3984	.000	3.542	6.458
	ekstrak 25%	5.6667	.3984	.000	4.208	7.125
	ekstrak 12,5%	6.3333	.3984	.000	4.875	7.792
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-6.6667	.3984	.000	-8.125	-5.208

	kontrol negatif (DMSO 5%)	17.3333	.3984	.000	15.875	18.792
etil asetat 12,5%	n-heksan 50%	6.6667	.3984	.000	5.208	8.125
	n-heksan 25%	7.3333	.3984	.000	5.875	8.792
	n-heksan 12,5%	8.0000	.3984	.000	6.542	9.458
	etil asetat 50%	-4.0000	.3984	.000	-5.458	-2.542
	etil asetat 25%	-1.6667	.3984	.015	-3.125	-.208
	air 50%	5.0000	.3984	.000	3.542	6.458
	air 25%	6.0000	.3984	.000	4.542	7.458
	air 12,5%	7.0000	.3984	.000	5.542	8.458
	ekstrak 50%	3.3333	.3984	.000	1.875	4.792
	ekstrak 25%	4.0000	.3984	.000	2.542	5.458
	ekstrak 12,5%	4.6667	.3984	.000	3.208	6.125
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-8.3333	.3984	.000	-9.792	-6.875
	kontrol negatif (DMSO 5%)	15.6667	.3984	.000	14.208	17.125
	air 50%	n-heksan 50%	1.6667	.3984	.015	.208
n-heksan 25%		2.3333	.3984	.000	.875	3.792
n-heksan 12,5%		3.0000	.3984	.000	1.542	4.458
etil asetat 50%		-9.0000	.3984	.000	-10.458	-7.542
etil asetat 25%		-6.6667	.3984	.000	-8.125	-5.208
etil asetat 12,5%		-5.0000	.3984	.000	-6.458	-3.542
air 25%		1.0000	.3984	.436	-.458	2.458
air 12,5%		2.0000	.3984	.002	.542	3.458
ekstrak 50%		-1.6667	.3984	.015	-3.125	-.208
ekstrak 25%		-1.0000	.3984	.436	-2.458	.458
ekstrak 12,5%		-.3333	.3984	1.000	-1.792	1.125
kontrol positif (kotrimoksazol)		-13.3333	.3984	.000	-14.792	-11.875
kontrol negatif (DMSO 5%)		10.6667	.3984	.000	9.208	12.125
air 25%		n-heksan 50%	.6667	.3984	.909	-.792
	n-heksan 25%	1.3333	.3984	.099	-.125	2.792
	n-heksan 12,5%	2.0000	.3984	.002	.542	3.458
	etil asetat 50%	-10.0000	.3984	.000	-11.458	-8.542
	etil asetat 25%	-7.6667	.3984	.000	-9.125	-6.208
	etil asetat 12,5%	-6.0000	.3984	.000	-7.458	-4.542
	air 50%	-1.0000	.3984	.436	-2.458	.458
	air 12,5%	1.0000	.3984	.436	-.458	2.458
	ekstrak 50%	-2.6667	.3984	.000	-4.125	-1.208
	ekstrak 25%	-2.0000	.3984	.002	-3.458	-.542
	ekstrak 12,5%	-1.3333	.3984	.099	-2.792	.125
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-14.3333	.3984	.000	-15.792	-12.875
	kontrol negatif (DMSO 5%)	9.6667	.3984	.000	8.208	11.125
	air 12,5%	n-heksan 50%	-.3333	.3984	1.000	-1.792
n-heksan 25%		.3333	.3984	1.000	-1.125	1.792
n-heksan 12,5%		1.0000	.3984	.436	-.458	2.458
etil asetat 50%		-11.0000	.3984	.000	-12.458	-9.542
etil asetat 25%		-8.6667	.3984	.000	-10.125	-7.208
etil asetat 12,5%		-7.0000	.3984	.000	-8.458	-5.542

	air 50%	-2.0000	.3984	.002	-3.458	-.542
	air 25%	-1.0000	.3984	.436	-2.458	.458
	ekstrak 50%	-3.6667	.3984	.000	-5.125	-2.208
	ekstrak 25%	-3.0000	.3984	.000	-4.458	-1.542
	ekstrak 12,5%	-2.3333	.3984	.000	-3.792	-.875
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-15.3333	.3984	.000	-16.792	-13.875
	kontrol negatif (DMSO 5%)	8.6667	.3984	.000	7.208	10.125
ekstrak 50%	n-heksan 50%	3.3333	.3984	.000	1.875	4.792
	n-heksan 25%	4.0000	.3984	.000	2.542	5.458
	n-heksan 12,5%	4.6667	.3984	.000	3.208	6.125
	etil asetat 50%	-7.3333	.3984	.000	-8.792	-5.875
	etil asetat 25%	-5.0000	.3984	.000	-6.458	-3.542
	etil asetat 12,5%	-3.3333	.3984	.000	-4.792	-1.875
	air 50%	1.6667	.3984	.015	.208	3.125
	air 25%	2.6667	.3984	.000	1.208	4.125
	air 12,5%	3.6667	.3984	.000	2.208	5.125
	ekstrak 25%	.6667	.3984	.909	-.792	2.125
	ekstrak 12,5%	1.3333	.3984	.099	-.125	2.792
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-11.6667	.3984	.000	-13.125	-10.208
	kontrol negatif (DMSO 5%)	12.3333	.3984	.000	10.875	13.792
ekstrak 25%	n-heksan 50%	2.6667	.3984	.000	1.208	4.125
	n-heksan 25%	3.3333	.3984	.000	1.875	4.792
	n-heksan 12,5%	4.0000	.3984	.000	2.542	5.458
	etil asetat 50%	-8.0000	.3984	.000	-9.458	-6.542
	etil asetat 25%	-5.6667	.3984	.000	-7.125	-4.208
	etil asetat 12,5%	-4.0000	.3984	.000	-5.458	-2.542
	air 50%	1.0000	.3984	.436	-.458	2.458
	air 25%	2.0000	.3984	.002	.542	3.458
	air 12,5%	3.0000	.3984	.000	1.542	4.458
	ekstrak 50%	-.6667	.3984	.909	-2.125	.792
	ekstrak 12,5%	.6667	.3984	.909	-.792	2.125
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-12.3333	.3984	.000	-13.792	-10.875
	kontrol negatif (DMSO 5%)	11.6667	.3984	.000	10.208	13.125
ekstrak 12,5%	n-heksan 50%	2.0000	.3984	.002	.542	3.458
	n-heksan 25%	2.6667	.3984	.000	1.208	4.125
	n-heksan 12,5%	3.3333	.3984	.000	1.875	4.792
	etil asetat 50%	-8.6667	.3984	.000	-10.125	-7.208
	etil asetat 25%	-6.3333	.3984	.000	-7.792	-4.875
	etil asetat 12,5%	-4.6667	.3984	.000	-6.125	-3.208
	air 50%	.3333	.3984	1.000	-1.125	1.792
	air 25%	1.3333	.3984	.099	-.125	2.792
	air 12,5%	2.3333	.3984	.000	.875	3.792
	ekstrak 50%	-1.3333	.3984	.099	-2.792	.125
	ekstrak 25%	-.6667	.3984	.909	-2.125	.792
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-13.0000	.3984	.000	-14.458	-11.542

	kontrol negatif (DMSO 5%)	11.0000	.3984	.000	9.542	12.458	
kontrol positif (kotrimoksazol)	n-heksan 50%	15.0000	.3984	.000	13.542	16.458	
	n-heksan 25%	15.6667	.3984	.000	14.208	17.125	
	n-heksan 12,5%	16.3333	.3984	.000	14.875	17.792	
	etil asetat 50%	4.3333	.3984	.000	2.875	5.792	
	etil asetat 25%	6.6667	.3984	.000	5.208	8.125	
	etil asetat 12,5%	8.3333	.3984	.000	6.875	9.792	
	air 50%	13.3333	.3984	.000	11.875	14.792	
	air 25%	14.3333	.3984	.000	12.875	15.792	
	air 12,5%	15.3333	.3984	.000	13.875	16.792	
	ekstrak 50%	11.6667	.3984	.000	10.208	13.125	
	ekstrak 25%	12.3333	.3984	.000	10.875	13.792	
	ekstrak 12,5%	13.0000	.3984	.000	11.542	14.458	
	kontrol negatif (DMSO 5%)	24.0000	.3984	.000	22.542	25.458	
	kontrol negatif (DMSO 5%)	n-heksan 50%	-9.0000	.3984	.000	-10.458	-7.542
		n-heksan 25%	-8.3333	.3984	.000	-9.792	-6.875
n-heksan 12,5%		-7.6667	.3984	.000	-9.125	-6.208	
etil asetat 50%		-19.6667	.3984	.000	-21.125	-18.208	
etil asetat 25%		-17.3333	.3984	.000	-18.792	-15.875	
etil asetat 12,5%		-15.6667	.3984	.000	-17.125	-14.208	
air 50%		-10.6667	.3984	.000	-12.125	-9.208	
air 25%		-9.6667	.3984	.000	-11.125	-8.208	
air 12,5%		-8.6667	.3984	.000	-10.125	-7.208	
ekstrak 50%		-12.3333	.3984	.000	-13.792	-10.875	
ekstrak 25%		-11.6667	.3984	.000	-13.125	-10.208	
ekstrak 12,5%		-11.0000	.3984	.000	-12.458	-9.542	
kontrol positif (kotrimoksazol)		-24.0000	.3984	.000	-25.458	-22.542	
Bonferroni		n-heksan 50%	.6667	.3984	1.000	-.887	2.220
	n-heksan 25%	1.3333	.3984	.213	-.220	2.887	
	n-heksan 12,5%	-10.6667	.3984	.000	-12.220	-9.113	
	etil asetat 50%	-8.3333	.3984	.000	-9.887	-6.780	
	etil asetat 25%	-6.6667	.3984	.000	-8.220	-5.113	
	etil asetat 12,5%	-1.6667	.3984	.023	-3.220	-.113	
	air 50%	-.6667	.3984	1.000	-2.220	.887	
	air 25%	.3333	.3984	1.000	-1.220	1.887	
	air 12,5%	-3.3333	.3984	.000	-4.887	-1.780	
	ekstrak 50%	-2.6667	.3984	.000	-4.220	-1.113	
	ekstrak 25%	-2.0000	.3984	.002	-3.554	-.446	
	ekstrak 12,5%	-15.0000	.3984	.000	-16.554	-13.446	
	kontrol positif (kotrimoksazol)	9.0000	.3984	.000	7.446	10.554	
	kontrol negatif (DMSO 5%)						
	n-heksan 25%	n-heksan 50%	-.6667	.3984	1.000	-2.220	.887
n-heksan 12,5%		.6667	.3984	1.000	-.887	2.220	
etil asetat 50%		-11.3333	.3984	.000	-12.887	-9.780	
etil asetat 25%		-9.0000	.3984	.000	-10.554	-7.446	
etil asetat 12,5%		-7.3333	.3984	.000	-8.887	-5.780	
air 50%		-2.3333	.3984	.000	-3.887	-.780	
air 25%		-1.3333	.3984	.213	-2.887	.220	

	air 12,5%	-0.3333	.3984	1.000	-1.887	1.220
	ekstrak 50%	-4.0000	.3984	.000	-5.554	-2.446
	ekstrak 25%	-3.3333	.3984	.000	-4.887	-1.780
	ekstrak 12,5%	-2.6667	.3984	.000	-4.220	-1.113
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-15.6667	.3984	.000	-17.220	-14.113
	kontrol negatif (DMSO 5%)	8.3333	.3984	.000	6.780	9.887
n-heksan 12,5%	n-heksan 50%	-1.3333	.3984	.213	-2.887	.220
	n-heksan 25%	-.6667	.3984	1.000	-2.220	.887
	etil asetat 50%	-12.0000	.3984	.000	-13.554	-10.446
	etil asetat 25%	-9.6667	.3984	.000	-11.220	-8.113
	etil asetat 12,5%	-8.0000	.3984	.000	-9.554	-6.446
	air 50%	-3.0000	.3984	.000	-4.554	-1.446
	air 25%	-2.0000	.3984	.002	-3.554	-.446
	air 12,5%	-1.0000	.3984	1.000	-2.554	.554
	ekstrak 50%	-4.6667	.3984	.000	-6.220	-3.113
	ekstrak 25%	-4.0000	.3984	.000	-5.554	-2.446
	ekstrak 12,5%	-3.3333	.3984	.000	-4.887	-1.780
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-16.3333	.3984	.000	-17.887	-14.780
	kontrol negatif (DMSO 5%)	7.6667	.3984	.000	6.113	9.220
etil asetat 50%	n-heksan 50%	10.6667	.3984	.000	9.113	12.220
	n-heksan 25%	11.3333	.3984	.000	9.780	12.887
	n-heksan 12,5%	12.0000	.3984	.000	10.446	13.554
	etil asetat 25%	2.3333	.3984	.000	.780	3.887
	etil asetat 12,5%	4.0000	.3984	.000	2.446	5.554
	air 50%	9.0000	.3984	.000	7.446	10.554
	air 25%	10.0000	.3984	.000	8.446	11.554
	air 12,5%	11.0000	.3984	.000	9.446	12.554
	ekstrak 50%	7.3333	.3984	.000	5.780	8.887
	ekstrak 25%	8.0000	.3984	.000	6.446	9.554
	ekstrak 12,5%	8.6667	.3984	.000	7.113	10.220
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-4.3333	.3984	.000	-5.887	-2.780
	kontrol negatif (DMSO 5%)	19.6667	.3984	.000	18.113	21.220
etil asetat 25%	n-heksan 50%	8.3333	.3984	.000	6.780	9.887
	n-heksan 25%	9.0000	.3984	.000	7.446	10.554
	n-heksan 12,5%	9.6667	.3984	.000	8.113	11.220
	etil asetat 50%	-2.3333	.3984	.000	-3.887	-.780
	etil asetat 12,5%	1.6667	.3984	.023	.113	3.220
	air 50%	6.6667	.3984	.000	5.113	8.220
	air 25%	7.6667	.3984	.000	6.113	9.220
	air 12,5%	8.6667	.3984	.000	7.113	10.220
	ekstrak 50%	5.0000	.3984	.000	3.446	6.554
	ekstrak 25%	5.6667	.3984	.000	4.113	7.220
	ekstrak 12,5%	6.3333	.3984	.000	4.780	7.887
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-6.6667	.3984	.000	-8.220	-5.113
	kontrol negatif (DMSO 5%)	17.3333	.3984	.000	15.780	18.887

etil asetat 12,5%	n-heksan 50%	6.6667	.3984	.000	5.113	8.220
	n-heksan 25%	7.3333	.3984	.000	5.780	8.887
	n-heksan 12,5%	8.0000	.3984	.000	6.446	9.554
	etil asetat 50%	-4.0000	.3984	.000	-5.554	-2.446
	etil asetat 25%	-1.6667	.3984	.023	-3.220	-.113
	air 50%	5.0000	.3984	.000	3.446	6.554
	air 25%	6.0000	.3984	.000	4.446	7.554
	air 12,5%	7.0000	.3984	.000	5.446	8.554
	ekstrak 50%	3.3333	.3984	.000	1.780	4.887
	ekstrak 25%	4.0000	.3984	.000	2.446	5.554
	ekstrak 12,5%	4.6667	.3984	.000	3.113	6.220
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-8.3333	.3984	.000	-9.887	-6.780
	kontrol negatif (DMSO 5%)	15.6667	.3984	.000	14.113	17.220
	air 50%	n-heksan 50%	1.6667	.3984	.023	.113
n-heksan 25%		2.3333	.3984	.000	.780	3.887
n-heksan 12,5%		3.0000	.3984	.000	1.446	4.554
etil asetat 50%		-9.0000	.3984	.000	-10.554	-7.446
etil asetat 25%		-6.6667	.3984	.000	-8.220	-5.113
etil asetat 12,5%		-5.0000	.3984	.000	-6.554	-3.446
air 25%		1.0000	.3984	1.000	-.554	2.554
air 12,5%		2.0000	.3984	.002	.446	3.554
ekstrak 50%		-1.6667	.3984	.023	-3.220	-.113
ekstrak 25%		-1.0000	.3984	1.000	-2.554	.554
ekstrak 12,5%		-.3333	.3984	1.000	-1.887	1.220
kontrol positif (kotrimoksazol)		-13.3333	.3984	.000	-14.887	-11.780
kontrol negatif (DMSO 5%)		10.6667	.3984	.000	9.113	12.220
air 25%		n-heksan 50%	.6667	.3984	1.000	-.887
	n-heksan 25%	1.3333	.3984	.213	-.220	2.887
	n-heksan 12,5%	2.0000	.3984	.002	.446	3.554
	etil asetat 50%	-10.0000	.3984	.000	-11.554	-8.446
	etil asetat 25%	-7.6667	.3984	.000	-9.220	-6.113
	etil asetat 12,5%	-6.0000	.3984	.000	-7.554	-4.446
	air 50%	-1.0000	.3984	1.000	-2.554	.554
	air 12,5%	1.0000	.3984	1.000	-.554	2.554
	ekstrak 50%	-2.6667	.3984	.000	-4.220	-1.113
	ekstrak 25%	-2.0000	.3984	.002	-3.554	-.446
	ekstrak 12,5%	-1.3333	.3984	.213	-2.887	.220
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-14.3333	.3984	.000	-15.887	-12.780
	kontrol negatif (DMSO 5%)	9.6667	.3984	.000	8.113	11.220
	air 12,5%	n-heksan 50%	-.3333	.3984	1.000	-1.887
n-heksan 25%		.3333	.3984	1.000	-1.220	1.887
n-heksan 12,5%		1.0000	.3984	1.000	-.554	2.554
etil asetat 50%		-11.0000	.3984	.000	-12.554	-9.446
etil asetat 25%		-8.6667	.3984	.000	-10.220	-7.113
etil asetat 12,5%		-7.0000	.3984	.000	-8.554	-5.446
air 50%		-2.0000	.3984	.002	-3.554	-.446
air 25%		-1.0000	.3984	1.000	-2.554	.554

	ekstrak 50%	-3.6667	.3984	.000	-5.220	-2.113
	ekstrak 25%	-3.0000	.3984	.000	-4.554	-1.446
	ekstrak 12,5%	-2.3333	.3984	.000	-3.887	-.780
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-15.3333	.3984	.000	-16.887	-13.780
	kontrol negatif (DMSO 5%)	8.6667	.3984	.000	7.113	10.220
ekstrak 50%	n-heksan 50%	3.3333	.3984	.000	1.780	4.887
	n-heksan 25%	4.0000	.3984	.000	2.446	5.554
	n-heksan 12,5%	4.6667	.3984	.000	3.113	6.220
	etil asetat 50%	-7.3333	.3984	.000	-8.887	-5.780
	etil asetat 25%	-5.0000	.3984	.000	-6.554	-3.446
	etil asetat 12,5%	-3.3333	.3984	.000	-4.887	-1.780
	air 50%	1.6667	.3984	.023	.113	3.220
	air 25%	2.6667	.3984	.000	1.113	4.220
	air 12,5%	3.6667	.3984	.000	2.113	5.220
	ekstrak 25%	.6667	.3984	1.000	-.887	2.220
	ekstrak 12,5%	1.3333	.3984	.213	-.220	2.887
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-11.6667	.3984	.000	-13.220	-10.113
	kontrol negatif (DMSO 5%)	12.3333	.3984	.000	10.780	13.887
ekstrak 25%	n-heksan 50%	2.6667	.3984	.000	1.113	4.220
	n-heksan 25%	3.3333	.3984	.000	1.780	4.887
	n-heksan 12,5%	4.0000	.3984	.000	2.446	5.554
	etil asetat 50%	-8.0000	.3984	.000	-9.554	-6.446
	etil asetat 25%	-5.6667	.3984	.000	-7.220	-4.113
	etil asetat 12,5%	-4.0000	.3984	.000	-5.554	-2.446
	air 50%	1.0000	.3984	1.000	-.554	2.554
	air 25%	2.0000	.3984	.002	.446	3.554
	air 12,5%	3.0000	.3984	.000	1.446	4.554
	ekstrak 50%	-.6667	.3984	1.000	-2.220	.887
	ekstrak 12,5%	.6667	.3984	1.000	-.887	2.220
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-12.3333	.3984	.000	-13.887	-10.780
	kontrol negatif (DMSO 5%)	11.6667	.3984	.000	10.113	13.220
ekstrak 12,5%	n-heksan 50%	2.0000	.3984	.002	.446	3.554
	n-heksan 25%	2.6667	.3984	.000	1.113	4.220
	n-heksan 12,5%	3.3333	.3984	.000	1.780	4.887
	etil asetat 50%	-8.6667	.3984	.000	-10.220	-7.113
	etil asetat 25%	-6.3333	.3984	.000	-7.887	-4.780
	etil asetat 12,5%	-4.6667	.3984	.000	-6.220	-3.113
	air 50%	.3333	.3984	1.000	-1.220	1.887
	air 25%	1.3333	.3984	.213	-.220	2.887
	air 12,5%	2.3333	.3984	.000	.780	3.887
	ekstrak 50%	-1.3333	.3984	.213	-2.887	.220
	ekstrak 25%	-.6667	.3984	1.000	-2.220	.887
	kontrol positif (kotrimoksazol)	-13.0000	.3984	.000	-14.554	-11.446
	kontrol negatif (DMSO 5%)	11.0000	.3984	.000	9.446	12.554

kontrol positif (kotrimoksazol)	n-heksan 50%	15.0000	.3984	.000	13.446	16.554
	n-heksan 25%	15.6667	.3984	.000	14.113	17.220
	n-heksan 12,5%	16.3333	.3984	.000	14.780	17.887
	etil asetat 50%	4.3333	.3984	.000	2.780	5.887
	etil asetat 25%	6.6667	.3984	.000	5.113	8.220
	etil asetat 12,5%	8.3333	.3984	.000	6.780	9.887
	air 50%	13.3333	.3984	.000	11.780	14.887
	air 25%	14.3333	.3984	.000	12.780	15.887
	air 12,5%	15.3333	.3984	.000	13.780	16.887
	ekstrak 50%	11.6667	.3984	.000	10.113	13.220
	ekstrak 25%	12.3333	.3984	.000	10.780	13.887
	ekstrak 12,5%	13.0000	.3984	.000	11.446	14.554
	kontrol negatif (DMSO 5%)	24.0000	.3984	.000	22.446	25.554
	kontrol negatif (DMSO 5%)	n-heksan 50%	-9.0000	.3984	.000	-10.554
n-heksan 25%		-8.3333	.3984	.000	-9.887	-6.780
n-heksan 12,5%		-7.6667	.3984	.000	-9.220	-6.113
etil asetat 50%		-19.6667	.3984	.000	-21.220	-18.113
etil asetat 25%		-17.3333	.3984	.000	-18.887	-15.780
etil asetat 12,5%		-15.6667	.3984	.000	-17.220	-14.113
air 50%		-10.6667	.3984	.000	-12.220	-9.113
air 25%		-9.6667	.3984	.000	-11.220	-8.113
air 12,5%		-8.6667	.3984	.000	-10.220	-7.113
ekstrak 50%		-12.3333	.3984	.000	-13.887	-10.780
ekstrak 25%		-11.6667	.3984	.000	-13.220	-10.113
ekstrak 12,5%		-11.0000	.3984	.000	-12.554	-9.446
kontrol positif (kotrimoksazol)		-24.0000	.3984	.000	-25.554	-22.446

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

Homogeneous Subsets

konsentrasi		N	Diameter										
			Subset for alpha = 0.05										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Tukey HSD ^a	kontrol negatif (DMSO 5%)	3	.000										
	n-heksan 12,5%	3		7.667									
	n-heksan 25%	3		8.333	8.333								
	air 12,5%	3		8.667	8.667								
	n-heksan 50%	3		9.000	9.000								
	air 25%	3			9.667	9.667							
	air 50%	3				10.667	10.667						
	ekstrak 12,5%	3				11.000	11.000	11.000					
	ekstrak 25%	3					11.667	11.667					
	ekstrak 50%	3						12.333					
	etil asetat 12,5%	3							15.667				
	etil asetat 25%	3								17.333			
	etil asetat 50%	3									19.667		
	kontrol positif (kotrimoksazol)	3											24.000
Sig.			1.000	.099	.099	.099	.436	.099	1.000	1.000	1.000	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.