

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR
DARI EKSTRAK ETANOL DAUN YODIUM (*Jatropha multifida* L.)
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**



Oleh:
Siti Nur Hikmah
19133788A

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR
DARI EKSTRAK ETANOL DAUN YODIUM (*Jatropha multifida* L.)
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

SKRIPSI

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

**Oleh:
Siti Nur Hikmah
19133788A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul :

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR
DARI EKSTRAK ETANOL DAUN YODIUM (*Jatropha multifida* L.)
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Oleh:

Siti Nur Hikmah
19133788A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 7 Juni 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Dekan,



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

Pembimbing utama,

Dr. Ana Indrayati, M.Si.

Pembimbing pendamping,

Reslely Harjanti, M.Sc., Apt.

Penguji :

1. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt.
2. Hery M. Ansory, S.Pd., M.Sc.
3. D. Andang Arif Wibawa, S.P., M.Si.
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si.

1.
2.
3.
4.

Persembahan

“Barang siapa yang menginginkan kebahagiaan di dunia maka haruslah dengan ilmu, barang siapa yang menginginkan kebahagiaan di akhirat haruslah dengan ilmu, dan barang siapa yang menginginkan kebahagiaan pada keduanya maka haruslah dengan ilmu”

(HR. Ibn Asakir)

“Sesungguhnya bersama kesukaran itu ada keringanan. Karena itu bila sudah selesai (mengerjakan yang lain). Dan berharaplah kepada Tuhanmu”

(Q.s Al-Insyirah : 6-8)

Skripsi ini saya persembahkan kepada :

Allah SWT

Kedua orang tua tercinta, atas setiap doa dan

Pengorbanan di setiap langkahku

Adikku tersayang

Sahabat-sahabatku

Almamater

PERNYATAAN

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, Mei 2017



Siti Nur Hikmah

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN YODIUM (*Jatropha multifida* L.) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853”** ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar kesarjanaan pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak, maka pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ir. Djoni Tarigan, MBA, selaku Rektor Universitas Setia Budi, Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., M.M., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.
3. Dr. Ana Indrayati, M.Si, selaku pembimbing utama yang dengan sabar meluangkan waktu, pengarahan dan dorongan semangat selama penulisan skripsi ini.
4. Reslely Harjanti, M.Sc., Apt, selaku pembimbing pendamping yang dengan sabar meluangkan waktu, pengarahan dan dorongan semangat selama penulisan skripsi ini.
5. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt, selaku tim penguji yang telah memberikan saran dan kritikan untuk perbaikan skripsi ini.
6. Hery M. Ansory, S.Pd., M.Sc, selaku tim penguji yang telah memberikan saran dan kritikan untuk perbaikan skripsi ini.
7. D. Andang Arif Wibawa, S.P., M.Si, selaku tim penguji yang telah memberikan saran dan kritikan untuk perbaikan skripsi ini.
8. Dosen dan karyawan serta teman seprofesi di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan kepada penulis.

9. Bapak, Ibu dan adikku tercinta yang selalu memberikan semangat, motivasi dan doa yang tiada akhir dan dukungan baik moril maupun materil selama ini.
10. Bapak, Ibu di perpustakaan dan Bapak/ Ibu di Laboratorium Teknologi Farmasi, Fitokimia dan Mikrobiologi yang telah banyak membantu dalam memperlancar pengerjaan penelitian skripsi ini.
11. Rekan mahasiswa dan segenap pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kelemahan dalam menyusun skripsi ini. Kritik dan saran dari siapapun yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapa saja yang mempelajarinya dan bermanfaat untuk masyarakat.

Surakarta, Mei 2017

Siti Nur Hikmah

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xv
INTISARI.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Kegunaan Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Tanaman yodium (<i>Jatropha multifida</i> L.).....	5
1. Klasifikasi tanaman	5
2. Nama daerah.....	5
3. Morfologi tanaman	5
4. Kegunaan tanaman	6
5. Kandungan kimia	6
5.1 Alkaloid	6
5.2 Flavonoid.....	7
5.3 Saponin.....	7
5.4 Tanin.....	7
B. Simplisia	8
1. Pengertian simplisia	8
2. Pengumpulan simplisia.....	8
3. Pengeringan simplisia.....	8

C.	Ekstraksi	9
1.	Pengertian ekstraksi.....	9
2.	Ekstrak.....	9
3.	Maserasi.....	9
4.	Pelarut.....	10
4.1.	Etanol	10
4.2.	<i>n</i> -Heksana	11
4.3.	Etil Asetat.....	11
4.4.	Air	11
4.5.	DMSO	11
5.	Fraksinasi.....	11
D.	Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	12
E.	Tinjauan Bakteri	12
1.	Uraian tentang bakteri	12
2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.1	Klasifikasi.....	12
2.2	Morfologi.....	13
2.3	Toksin.....	13
2.4	Patogenesis	13
F.	Media.....	14
1.	Media padat	14
2.	Media cair	14
3.	Media semi cair atau padat	15
G.	Sterilisasi	15
H.	Siprofloksasin	15
I.	Antibakteri.....	16
1.	Mekanisme kerja antibakteri	16
1.1.	Penghambatan metabolisme sel	16
1.2.	Penghambatan sintesis dinding sel.....	17
1.3.	Penghambatan keutuhan membran sel.....	17
1.4.	Penghambatan sintesis protein.....	17
1.5.	Penghambatan sintesis asam nukleat.	18
2.	Metode Difusi.....	18
3.	Metode Dilusi	18
J.	Landasan Teori	18
K.	Hipotesis	21
BAB III METODE PENELITIAN.....		22
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.	Bahan dan Alat	24
1.	Bahan.....	24
1.1.	Bahan dan sampel	24

1.2.	Bahan kimia	24
1.3.	Medium	24
2.	Alat	24
D.	Jalannya Penelitian	24
1.	Determinasi tanaman	24
2.	Persiapan bahan	25
3.	Pengeringan daun yodium	25
4.	Penetapan kadar lembab serbuk daun yodium	25
5.	Pembuatan ekstrak etanol daun yodium	25
6.	Penetapan persen rendemen	26
7.	Uji bebas etanol ekstrak daun yodium	26
8.	Pembuatan fraksi daun yodium	26
9.	Identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun yodium	27
10.	Sterilisasi alat dan bahan	27
11.	Identifikasi bakteri <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	28
11.1.	Identifikasi bakteri secara goresan.....	28
11.2.	Identifikasi <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 dengan metode pengecatan.....	28
11.3.	Identifikasi biokimia <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	28
12.	Pembuatan suspensi bakteri uji	29
13.	Aktivitas antibakteri dengan metode Difusi	29
14.	Aktivitas antibakteri dengan metode Dilusi	30
15.	Identifikasi kandungan kimia fraksi paling aktif secara KLT	31
E.	Analisis Hasil.....	32
F.	Skema cara kerja.....	33
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		38
A.	Hasil Penelitian dan Pembahasan	38
1.	Determinasi tanaman yodium (<i>J. multifida</i>).....	38
2.	Pengambilan bahan.....	38
3.	Pengeringan daun yodium	38
4.	Penetapan kadar lembab serbuk daun yodium	39
5.	Pembuatan ekstrak etanol daun yodium	39
6.	Pengujian ekstrak daun yodium bebas etanol.....	40
7.	Fraksinasi ekstrak daun yodium	41
7.1.	Fraksi <i>n</i> - heksana.	41
7.2.	Fraksi etil asetat dan air.	42
8.	Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun yodium.....	43
9.	Identifikasi bakteri uji dan identifikasi uji biokimia	44
11.1.	Hasil identifikasi <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 secara goresan	44
11.2.	Identifikasi bakteri <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 dengan pengecatan Gram.....	44

11.3. Identifikasi bakteri uji secara biokimia.....	45
10. Pengujian antibakteri daun yodium secara difusi.....	46
11. Pengujian antibakteri fraksi teraktif daun yodium secara dilusi	49
12. Identifikasi kandungan kimia fraksi secara kualitatif.....	51
13. Identifikasi kimia fraksi paling aktif secara KLT	52
13.1 Identifikasi senyawa alkaloid secara KLT	53
13.2 Identifikasi senyawa flavonoid secara KLT.	53
13.3 Identifikasi senyawa saponin secara KLT.	55
13.4 Identifikasi senyawa tanin secara KLT.....	55
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	 57
A. Kesimpulan.....	57
B. Saran	57
 DAFTAR PUSTAKA	 58
 LAMPIRAN.....	 65

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Foto tanaman yodium.....	5
Gambar 2. Skema diagram kerja penyarian daun yodium secara maserasi	33
Gambar 3. Skema pembuatan fraksi	34
Gambar 4. Skema pembuatan suspensi.....	35
Gambar 5. Skema kerja aktivitas antibakteri dengan metode Difusi	36
Gambar 6. Skema kerja aktivitas antibakteri fraksi daun yodium terhadap <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 dengan metode Dilusi	37
Gambar 7. Hasil identifikasi alkaloid.....	53
Gambar 8. Hasil identifikasi flavonoid	54
Gambar 9. Hasil identifikasi saponin	55
Gambar 10. Hasil identifikasi tanin	56

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun yodium.....	39
Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab menggunakan alat <i>moisture balance</i> .	39
Tabel 3. Persentase bobot ekstrak maserasi daun yodium	40
Tabel 4. Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi daun yodium (<i>J. multifida</i>)..	41
Tabel 5. Rendemen fraksi <i>n</i> -heksana daun yodium	42
Tabel 6. Rendemen fraksi etil asetat daun yodium	42
Tabel 7. Rendemen fraksi air daun yodium	42
Tabel 8. Hasil identifikasi kimia serbuk dan ekstrak daun yodium	43
Tabel 9. Hasil identifikasi uji biokimia pada bakteri <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	45
Tabel 10. Diameter hambat pada uji antibakteri daun yodium terhadap <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 secara difusi	47
Tabel 11. Hasil aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak daun yodium terhadap <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	50
Tabel 12. Hasil uji aktivitas antibakteri Siprofloksain terhadap <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	51
Tabel 13. Hasil identifikasi kimia fraksi daun yodium	52
Tabel 14. Hasil identifikasi alkaloid secara KLT	53
Tabel 15. Hasil identifikasi flavonoid secara KLT	54
Tabel 16. Hasil identifikasi saponin secara KLT	55
Tabel 17. Hasil identifikasi tanin secara KLT.....	55

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Determinasi tanaman daun yodium (<i>J. multifida</i>).....	66
Lampiran 2. Foto tanaman yodium (<i>J. multifida</i>) dan serbuk daun yodium	67
Lampiran 3. Foto ekstrak daun yodium, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan air.....	68
Lampiran 4. Foto identifikasi kimia serbuk dan ekstrak daun yodium	69
Lampiran 5. Foto identifikasi fraksi daun yodium secara kualitatif.....	70
Lampiran 6. Foto identifikasi kimia fraksi paling aktif secara KLT	71
Lampiran 7. Foto identifikasi bakteri secara goresan, pengecatan Gram, biokimia dan suspensi bakteri uji.....	73
Lampiran 8. Foto pengenceran ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air.....	74
Lampiran 9. Foto hasil uji difusi fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, air terhadap <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	75
Lampiran 10. Foto hasil uji dilusi fraksi teraktif terhadap <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	76
Lampiran 11. Foto alat <i>moisture balance</i> , botol maserasi, corong Buchner, evaporator dan corong pisah	79
Lampiran 12. Foto alat pengayak, timbangan, oven, inkubator, autoklaf	80
Lampiran 13. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun yodium.....	81
Lampiran 14. Perhitungan penetapan kadar lembab menggunakan alat <i>moisture balance</i>	82
Lampiran 15. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air.....	83
Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media	85
Lampiran 17. Perhitungan pengenceran DMSO (<i>Dimethyl Sulfoxida</i>)	88

Lampiran 18.	Pembuatan sediaan untuk uji difusi dan dilusi.....	89
Lampiran 19.	Perhitungan pengujian dosis antibiotik Siprofloksasin	93
Lampiran 20.	Standart kekeruhan Mc Farland	95
Lampiran 21.	Hasil KLT fraksi etil asetat	96
Lampiran 22.	Analisis Data Hasil Difusi.....	98

DAFTAR SINGKATAN

KHM	Konsentrasi Hambat Minimum
KBM	Konsentrasi Bunuh Minimum
BHI	Brain Heart Infusion
CFU	Colony Forming Unit
PSA	Pseudomonas Selektif Agar
SIM	Sulfida Indol Motility
KIA	Klinger Iron Agar
LIA	Lisin Iron Agar
MHA	Muller Hinton Agar
ATTC	American Type Culture Collection
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
Rf	Retention Factor

INTISARI

Hikmah, S.N., 2017, AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN YODIUM (*Jatropha multifida* L.) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Daun yodium (*J. multifida*) merupakan tanaman suku Euphorbiaceae. Kandungan kimia daun yodium adalah alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin yang bersifat sebagai antibakteri. Dalam penelitian ini, daun yodium dieksplorasi kegunaannya sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui efektifitas ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun yodium terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Ekstraksi daun yodium dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dilanjutkan fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dengan konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi yang digunakan adalah 50%, 25% dan 12,5%. Metode dilusi dengan konsentrasi fraksi etil asetat 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%, 0,78125%, dan 0,390625%. Fraksi paling aktif diuji kandungan kimia secara KLT.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun yodium (*J. multifida*), fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853. Fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling aktif dengan rata-rata diameter hambat yaitu pada konsentrasi 50% sebesar 14,7 mm, konsentrasi 25% sebesar 14,4 mm dan pada konsentrasi 12,5% sebesar 11,7 mm. Konsentrasi Bunuh Minimum fraksi etil asetat terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 sebesar 12,5%. Fraksi paling aktif etil asetat diuji kandungan kimia secara KLT. Hasil identifikasi menunjukkan fraksi etil asetat positif mengandung alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin.

Kata kunci : Daun yodium (*J. multifida*), *P. aeruginosa* ATCC 27853, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air.

ABSTRACT

Hikmah, S.N., 2017, ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *n*-HEXANE, ETHYL ACETAT AND WATER FRACTION OF YODIUM LEAF (*Jatropha multifida* L.) ETHANOL EXTRACT AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Yodium leaf (*J. multifida*) is a plant of Euphorbiaceae. Yodium leaf chemical constituents are alkaloids, flavonoids, saponins and tannins that are antibacterial. In this study, yodium leaf explored its use as an antibacterial against *P. aeruginosa* ATCC 27853. The aim of the study was to find out the effectiveness of ethanol extract, *n*-hexana, ethyl acetate and water fraction of yodium leaf against *P. aeruginosa* ATCC 27853.

The extraction of yodium leaf by maceration method used ethanol 70% solvent, followed by fractionation with *n*-hexana, ethyl acetate and water solvents. The antibacterial activity test performed by the diffusion method and dilution method. Diffusion method by concentration ethanol extracts and fraction are used 50%, 25% and 12,5%. Dilution method by concentration ethyl acetate fraction are used 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%, 0,78125%, dan 0,390625%. The chemical contents of the most active fraction were tested by TLC.

The results showed that the ethanol extract of yodium leaf (*J. multifida*), of *n*-hexana, ethyl acetate and water fraction had antibacterial activity against *P. aeruginosa* ATCC 27853. Ethyl acetate fraction was the most active fraction with an average of inhibition diameter at concentrations of 50% was 14,7 mm, concentration of 25% was 14,4 mm and concentration 12,5% was 11,7 mm. Minimum kill concentration ethyl acetate fraction against *P. aeruginosa* ATCC 27853 of 12,5%. The chemical contents of the most effective ethyl acetate fraction were tested by TLC. The result of identification showed that ethyl acetate fraction positively contained alkaloid, flavonoids, saponin and tannin.

Keywords : Yodium leaf (*J. multifida*), *P. aeruginosa* ATCC 27853, *n*-hexana, ethyl acetate and water fraction.

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Indonesia merupakan negara mega Biodiversitas yang memiliki kekayaan alam tumbuhan di Indonesia meliputi 30.000 jenis tumbuhan dari total 40.000 jenis tumbuhan di dunia. Berdasarkan hasil penelitian, dari sekian banyak jenis tanaman obat, baru 20-22% yang dibudidayakan. Usaha meningkatkan derajat kesehatan masyarakat dilaksanakan berbagai upaya pembangunan di bidang kesehatan. Akan tetapi banyak tantangan dan kendala yang harus dihadapi, diantaranya adalah tingginya angka penyakit infeksi di masyarakat (Wahjono 2007). Penyakit infeksi masih menempati urutan tertinggi penyebab kesakitan dan kematian di negara-negara berkembang, termasuk Indonesia. Penyakit infeksi ini dapat disebabkan oleh bakteri, virus, parasit maupun jamur (Muhaimin 2003). Meskipun infeksi mikroba ini dapat diatasi dengan berbagai antibiotik, namun pemakaian antibiotik yang tidak tepat untuk pengobatan infeksi bakteri dapat memunculkan berbagai masalah setelah puluhan tahun pemakaiannya yaitu dapat menimbulkan resistensi terhadap antimikroba (Green 2005).

Resistensi bakteri terhadap antibakteri dapat menimbulkan infeksi nosokomial dan penyebabnya adalah bakteri RS (Rumah Sakit). Bakteri yang paling banyak ditemukan di rumah sakit umumnya adalah *Klebsiella sp*, *E. coli*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus sp*, dan *Streptococcus sp*. Bakteri *P. aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif, bergerak, aerob, beberapa di antaranya menghasilkan pigmen yang larut dalam air dan sering masuk ke dalam jaringan yang terkena luka atau luka bakar sehingga menimbulkan nanah (Jawetz 2001). Menanggulangi hal tersebut mulai dikembangkan penggunaan obat-obatan dari bahan alam. Obat dari bahan alam dapat diperoleh dari sumber mineral, tumbuh-tumbuhan atau hewan (Ansel 2008). Salah satunya adalah tanaman yodium (*J. multifida*).

J. multifida merupakan salah satu tanaman obat yang berasal dari familia Euphorbiaceae. *J. multifida* oleh masyarakat pedesaan dikenal dengan nama

tanaman yodium. Bagian dari tanaman yodium yang sering digunakan sebagai obat adalah daun maupun batang (Sari *et al.* 2011). Secara empiris daun yodium merupakan obat tradisional untuk mengobati luka akibat infeksi. Cara penggunaannya yaitu dengan mengambil getah pada daun atau batangnya kemudian ditempelkan pada tempat yang sakit. Kandungan kimia yang dimiliki tanaman yodium adalah kampesterol, alpha amirin, stigmaterol, 7 alpha diol, HCN dan beta-sitosterol, kandungan pada batang yodium adalah alkaloid (yang disebut-sebut penggumpal darah), flavonoid, saponin dan tanin (Syarifati *et al.* 2011). Selain itu, tanaman yodium ini juga mengandung sulfur dan iodin yang berperan sebagai zat antiseptik dan mempercepat penyembuhan luka bakar (Ilmi 2009).

Aiyelaagbe *et al.*, (2008) telah melakukan uji aktivitas tanaman yodium (*J. multifida*) terhadap beberapa jenis bakteri dan jamur penyebab penyakit kelamin. Uji fitokimia penelitian tersebut diketahui bahwa dalam tanaman yodium (*J. multifida*) mengandung saponin, steroids, glikosida, tanin, yang berbeda dari setiap bagian tanamannya, dimana kandungan zat-zat tersebutlah yang membuat *J. multifida* mempunyai fungsi sebagai antimikroba (Sari *et al.* 2011).

Berdasarkan kandungan kimia yang terdapat di dalamnya, daun yodium berpotensi sebagai antibakteri. Pada penelitian yang dilakukan oleh Aiyelaagbe *et al.* (2008) ekstrak dan fraksi menunjukkan potensial aktivitas antimikroba berbagai organisme dengan konsentrasi hambat minimum berkisar dari 0,75-12,5 μ^{-1} untuk fraksi. Penelitian aktivitas antibakteri daun yodium yang pernah diteliti adalah daya hambat getah jarak cina (*J. multifida*) terhadap *S. aureus* secara in vitro dengan nilai konsentrasi 50% zona hambat sebesar 13,5 mm (Darmawi *et al.* 2013), sedangkan menurut (Maryati 2013) konsentrasi 100% diameter pada ekstrak sebesar 7,67 mm.

Penelitian fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun yodium terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 belum pernah diteliti. Penelitian ini diharapkan mampu menemukan alternatif bahan antibakteri yang memiliki kemampuan mengobati luka baru, apalagi penelitian terhadap daun yodium masih sangat terbatas. Melengkapi data-data ilmiah dalam pemakaian obat tradisional tersebut maka dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan metode ekstraksi

yang digunakan adalah maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Sedangkan pada fraksinasi digunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air untuk memisahkan senyawa berdasarkan polaritasnya, dimana fraksi *n*-heksana akan melarutkan kandungan senyawa tanaman yang bersifat nonpolar seperti minyak atsiri, steroid dan terpenoid, etil asetat melarutkan senyawa yang bersifat semipolar seperti flavonoid aglikon, dan air merupakan pelarut polar yang akan melarutkan senyawa polar seperti saponin dan tanin (Susilowati 2010).

Aktivitas antibakteri dalam penelitian ini dilakukan dengan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dilakukan dengan mengamati diameter daerah hambatan pertumbuhan kuman. Metode ini dilakukan dengan cara menanam kuman pada media agar padat tertentu kemudian diletakkan kertas samir atau disk yang mengandung obat atau dapat juga dibuat sumuran kemudian diisi obat (Mulyadi *et al.* 2013). Metode dilusi dilakukan dengan penentuan KHM dan KBM. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni adalah KBM dari obat terhadap bakteri uji. Siprofloksasin digunakan sebagai kontrol positif dan DMSO 5% digunakan sebagai kontrol negatif.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

Pertama, apakah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun yodium mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853?

Kedua, dari ketiga fraksi atau ekstrak etanol daun yodium manakah yang paling efektif sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853?

Ketiga, berapakah KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dari fraksi teraktif terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853?

C. Tujuan Penelitian

Pertama, mengetahui ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun yodium mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, mengetahui ketiga fraksi atau ekstrak etanol daun yodium yang paling efektif sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Ketiga, mengetahui KHM dan KBM dari fraksi teraktif terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

D. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tambahan kepada masyarakat luas terutama pada peneliti di bidang farmasi, tentang potensi daun yodium sebagai antibakteri. Sehingga dapat dikembangkan penggunaannya sebagai salah satu pilihan terapi obat tradisional dan sebagai masukan dalam pengembangan obat-obat fitofarmaka.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman yodium (*Jatropha multifida* L.)

1. Klasifikasi tanaman



Gambar 1. Foto tanaman yodium

Tanaman yodium (*J. multifida*) memiliki klasifikasi sebagai berikut :

- Divisi : Spermaphyta
- Subdivisi : Angiospermae
- Class : Dicotyledoneae
- Familia : Euphorbiaceae
- Genus : Jatropha
- Spesies : *Jatropha multifida* L. (Depkes 2000)

2. Nama daerah

Tanaman yodium terdapat di berbagai wilayah di Indonesia, dan dikenal dengan berbagai nama. Menurut Hariana (2013) nama daerah tanaman yodium yaitu jarak cina, pohon yodium, jarak tintir (Jawa), jarak gurita (Sunda), balacai batai (Ternate).

3. Morfologi tanaman

Tanaman yodium ini memiliki daun tunggal, tersebar, panjang 15-20 cm, bulat, pertulangan menjari, ujung runcing, pangkal membulat, berwarna hijau (Hariana 2004). Tinggi tanaman yodium sekitar 2 meter, batang bulat, berkayu, pangkalnya membesar, bergetah. Daun yodium mempunyai lebar 2,5-4 cm, pertulangan menjari dan tepi rata. Berbunga majemuk berbentuk malai,

bertangkai, tumbuh di ujung cabang, panjang sekitar 1,5 cm biji bulat, jika masih muda berwarna putih dan setelah itu menjadi coklat (Hariana 2013).

4. Kegunaan tanaman

Secara empiris daun yodium berkhasiat sebagai obat luka, bengkak, terkilir dan tulang patah. Efek farmakologi daun yodium di antaranya penurunan panas serta anti inflamasi (Depkes 2000; Hariana 2013).

Penelitian-penelitian terdahulu telah melakukan uji aktivitas tanaman *J. multifida* terhadap beberapa jenis bakteri dan jamur penyebab penyakit kelamin. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa dalam tanaman *J. multifida* mengandung saponin, steroids, glicosida, tanin, yang berbeda dari setiap bagian tanamannya, dimana kandungan zat-zat tersebutlah yang membuat *J. multifida* mempunyai fungsi sebagai antimikroba. (Aiyelaagbe *et al.* 2008).

5. Kandungan kimia

Daun yodium mengandung beberapa zat berkhasiat seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin. Daun yodium juga mengandung sulfur dan iodine yang berperan sebagai zat antiseptik dan mempercepat penyembuhan luka (Syarfati *et al.* 2011).

5.1 Alkaloid. Alkaloid adalah suatu senyawa yang berasal dari tumbuhan, mengandung nitrogen, biasanya berbentuk heterosiklik dalam ikatan primer, sekunder atau kuartener, bersifat alkalis, dan pada umumnya berasa pahit dan memiliki aksi farmakologi tertentu. Alkaloid merupakan golongan zat tubular sekunder yang terbesar. Alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik. Steroid dan alkaloid steroid yang dimodifikasi terdapat sebagai glikosida C-3 atau ester yang menyerupai struktur saponin dan sebagai penolak serangga serta sebagai senyawa antifungus (Robinson 1995). Menurut Juliantina *et al.* (2008) alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut.

5.2 Flavonoid. Flavonoid adalah suatu kelompok fenol terbesar yang ditemukan di alam. Flavonoid telah menunjukkan perannya sebagai antibakteri, antimutagenik, antineoplastik dan aktivitas vasodilator (Windono *et al.* 2001). Flavonoid dalam bentuk glikon menyebabkan flavonoid larut dalam pelarut polar seperti air, sebaliknya aglikon yang kurang polar lebih mudah larut dalam pelarut seperti etil asetat, eter dan kloroform. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (IndoBIC 2005).

5.3 Saponin. Saponin adalah glikosida triterpena dan sterol yang telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuan membentuk busa dan menghemolisis sel darah. Triterpen tertentu terkenal karena rasanya, terutama kepahitannya. Pencarian saponin dalam tumbuhan telah dirangsang oleh kebutuhan akan sumber saponin yang mudah diperoleh. Saponin dan glikosida saponin adalah salah satu tipe glikosida yang tersebar luas dalam tumbuhan (Harborne 1987). Dikenal dua macam saponin, yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan glikosida dengan struktur steroid. Kedua saponin ini larut dalam air dan etanol tetapi tidak larut dalam eter. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah dapat menurunkan tegangan permukaan sehingga dapat melisiskan dinding bakteri (Robinson 1995).

5.4 Tanin. Tanin merupakan senyawa yang terkandung dalam daun yodium. Tanin sendiri mampu membentuk kompleks kuat dengan protein sehingga dapat menghambat penyerapan protein dalam pencernaan (antinutrisi). Kadar tanin dalam produk-produk pangan patut diperhatikan dan diinformulasikan secara cermat supaya kadarnya aman untuk pencernaan manusia. Sebagian besar tumbuhan yang banyak bertanin dihindari oleh hewan pemakan tumbuhan karena rasanya yang sepat, sehingga salah satu fungsi utama tanin dalam tumbuhan yaitu penolak hewan pemakan tumbuhan memiliki aktivitas antibakteri yang mampu menghambat enzim seperti DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Harborne 1987). Mekanisme kerja tanin sebagai antimikroba menurut

Naim (2004) berhubungan dengan kemampuan tanin dalam menginaktivasi adhesi sel mikroba (molekul yang menempel pada sel inang).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia merupakan bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengelolaan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibedakan menjadi simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan adalah isi sel yang secara spontan keluar dari selnya atau senyawa nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa senyawa murni (Depkes RI 2000).

2. Pengumpulan simplisia

Simplisia yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia nabati dan bagian yang digunakan adalah daun yang diambil secara acak dalam keadaan segar dari tanaman yodium yang masih muda, dikarenakan tingkat metabolismenya masih tinggi sehingga zat aktif yang terkandung didalamnya cukup besar (Hasibuan 2016). Pengumpulan daun dilakukan sedapat mungkin pada saat cuaca kering, apabila dilakukan pada saat hujan cuaca basah akan menurunkan mutu selama pengeringan (Koensemardiyah 2000).

3. Pengeringan simplisia

Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama dan untuk menjamin keawetan serta mencegah timbulnya bakteri dan jamur. Pengeringan secara alamiah dapat dilakukan dengan panas sinar matahari langsung. Cara ini dilakukan untuk mengeringkan bagian tanaman yang relatif keras seperti kayu, biji dan simplisia dengan kandungan senyawa aktif yang relatif stabil apabila terkena panas.

Pengeringan alamiah lainnya adalah dengan cara diangin-anginkan dan tidak dipanaskan di bawah sinar matahari langsung. Cara ini terutama untuk

mengeringkan bagian tanaman yang lunak seperti bunga dan daun. Selain cara alamiah yaitu pengeringan simplisia yang dilakukan menggunakan oven yang harus diperhatikan adalah jenis bahan, suhu pengeringan, dan waktu pengeringan sehingga simplisia tidak mudah rusak dan kandungan kimia yang berkhasiat tidak berubah karena proses fermentasi (Gunawan & Mulyani 2004).

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat pokok yang diinginkan dari bahan obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan akan larut. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dipilih berdasarkan kemampuan dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan seminimal mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel 1989).

2. Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan cara mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani yang menggunakan pelarut yang sesuai (Rahmawati 2010). Berdasarkan konsistensinya ekstrak dibagi menjadi tiga yaitu ekstrak cair, kental dan kering. Ekstrak cair merupakan sediaan cair hasil dari penyarian simplisia. Ekstrak kental merupakan sediaan kental yang dibuat dari simplisia kemudian diuapkan pelarutnya. Ekstrak kering merupakan sediaan berbentuk bubuk yang dibuat dari hasil tarikan simplisia yang diuapkan menggunakan pelarut sampai kering (Khoirani 2013).

3. 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 (Depkes 2000).

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri (Agoes 2007). Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai kedalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Caranya yaitu

dengan memasukkan satu bagian serbuk kering simplisia kedalam maserator, tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-kali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (Farmakope herbal 2013). 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. Metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani 2014).

Kerugiannya adalah pengerjaannya lama, membutuhkan pelarut yang banyak dan penyarian kurang sempurna. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan maserasi kinetik berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes 2000).

4. Pelarut

Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria antara lain murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisik dan kimia, bereaksi netral, selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki dan tidak mempengaruhi zat yang berkhasiat. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol, *n*-heksana, etil asetat dan air.

4.1. Etanol. Pelarut ideal yang sering digunakan adalah alkohol atau campurannya dengan air yang merupakan pelarut pengestraksi 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. Karena 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*-Heksana. Pelarut *n*-Heksana merupakan suatu campuran yang terdiri dari rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna, mudah terbakar, tidak dapat larut air, dapat larut dalam alkohol, benzen, kloroform, dan eter. *n*-Heksana merupakan senyawa non polar yang dapat melarutkan senyawa-senyawa minyak atsiri, lemak, steroid, triterpenoid, dan karetonoid (Depkes 1987).

4.3. Etil Asetat. Etil asetat merupakan pelarut semi polar, mudah terbakar dan menguap, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas. Etil asetat merupakan suatu cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah, larut 15 bagian air, dapat tercampur dalam eter, etanol dan kloroform. Senyawa yang larut dalam pelarut ini adalah flavonoid (Harborne 1987).

4.4. Air. Air digunakan sebagai cairan pelarut karena murah, mudah diperoleh stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun, alamiah. Air melarutkan garam, tanin dan gula (Depkes 1986).

4.5. DMSO. Dimethyl sulfoxida merupakan cairan kental, jernih, tidak berwarna, higroskopik, larut dalam air, dalam etanol 95% dan dalam eter (Farmakope Indonesia 1979).

5. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan suatu cara memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan kandungan utama yang lainnya. Suatu prosedur yang berdasarkan kepolaran. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar sedangkan yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar. Keuntungan fraksinasi adalah diperolehnya isolat atau senyawa yang lebih spesifik terhadap polaritas pelarut yang digunakan (Harborne 1996).

D. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode kromatografi yang paling sederhana. Melibatkan dua sifat fase yaitu sifat fase diam atau sifat lapisan dan sifat fase gerak atau campuran pelarut pengembang. Fase diam yaitu silika gel (asam silikat), alumina (aluminium oksida), kiselgur (tanah diatome), dan selulosa. Fase gerak dapat berupa hampir segala macam pelarut atau campuran pelarut. KLT dilakukan untuk menguji fraksi aktif dengan cara ekstrak atau fraksi aktif dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, kemudian ditotolkan di atas lempeng kromatografi, setelah totolan kering, lempeng KLT dimasukkan ke dalam bejana yang sudah jenuh oleh fase gerak yang sesuai. Pengembangan dilakukan sampai jarak tertentu, kemudian dilakukan deteksi di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm serta pereaksi tertentu. Bercak yang terdeteksi ditentukan harga Rf dan penampakan warnanya (Meirastuti *et al.* 2013).

E. Tinjauan Bakteri

1. Uraian tentang bakteri

Bakteri dapat dibedakan menjadi dua berdasarkan hasil pewarnaan Gram yaitu bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif berwarna ungu sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah. Bakteri berbentuk kokus yang patogen terhadap manusia bersifat positif Gram, sedangkan bakteri berbentuk batang dan spiral patogen bagi manusia umumnya bersifat negatif Gram karena bakteri yang tidak mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan Gram sehingga akan berwarna merah bila diamati dengan mikroskop.

2. *Pseudomonas aeruginosa*

2.1 Klasifikasi. Sistematika *P. aeruginosa* sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Family	: Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Spesies : *Pseudomonas aeruginosa* (Brook *et al.* 2001).

2.2 Morfologi. *P. aeruginosa* adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang lurus atau lengkung, berukuran sekitar $0,6 \times 2 \mu\text{m}$. Bakteri ditemukan satu-satu, berpasangan, dan kadang membentuk rantai pendek, tidak mempunyai spora, tidak mempunyai selubung, serta mempunyai flagel monotrika (flagel tunggal pada kutub) sehingga selalu bergerak (Mayasari 2006).

2.3 Toksin. *P. aeruginosa* menyebabkan infeksi luka dan luka bakar membentuk nanah yang berwarna biru-hijau, radang selaput otak. Infeksi jaringan kornea dapat menyebabkan kebutaan. Infeksi lokal bakteri ini dapat menyebar melalui darah, sehingga dapat menyebabkan septisemia dan lesi lokal pada jaringan lain. Pada septisemia angka kematian dapat mencapai 80% (Jawetz *et al.* 2007).

P. aeruginosa dapat mensintesis toksin dan enzim yang mematikan bagi manusia. Lipid A (eksotoksin) berada di dinding sel dari bakteri merupakan zat penyebab demam, vasodilatasi, inflamasi dan gejala lain. Eksotoksin A dan eksotoksin S dapat menghambat sintesis protein sel eukariotik yang menyebabkan kematian. *P. aeruginosa* juga memiliki enzim elastase yang dapat mempunyai efek histotoksik dan mempermudah invasi organisme ke dalam pembuluh darah (Bauman 2007).

2.4 Patogenesis. *P. aeruginosa* merupakan patogen utama bagi manusia. Bakteri ini kadang-kadang mengkolonisasi pada manusia dan menimbulkan infeksi apabila fungsi pertahanan inang abnormal. Bakteri ini melekat dan mengkoloni selaput mukosa atau kulit, menginfeksi darah, telinga, mata dan saluran kemih, pada luka bakar akan menyerang darahnya menghasilkan nanah (Mudihardi *et al.* 2005). *P. aeruginosa* disebut patogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi. Bakteri ini dapat juga tinggal pada manusia yang normal dan berlaku saprofit pada usus normal dan pada kulit manusia.

P. aeruginosa memproduksi sitotoksin dan protease misalnya eksotoksin A dan S, hemolisin, dan elastase. Isolat dari pasien fibrosis kistik menghasilkan

alginat polisakarida, memungkinkan terbentuknya mikrokoloni dimana organisme terlindung dari opsonisasi, fagositosis, dan antibiotik. Alginat, pili, dan protein membran luar memperantarai penempelan. Produksi alginat berhubungan dengan kerentanan yang berlebihan terhadap antibiotik, defisiensi, LPS, non motilitas, dan perubahan produksi eksotoksin (Bamford & Gillespie 2007).

F. Media

Media adalah bahan yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme. Mikroorganisme sebagai makhluk hidup mempunyai kebutuhan dasar yang sama yaitu air, karbon, energi, mineral dan faktor tumbuh. Keasaman media yang sangat dipengaruhi oleh pH, sebagian besar bakteri tumbuh paling baik pada sekitar pH 7 (Suriawiria 1985).

Fungsi media antara lain untuk menumbuhkan mikroba, untuk mengisolasi mikroba, untuk memperbanyak mikroba, untuk menguji sifat-sifat mikroba, untuk menghitung jumlah mikroba, dan untuk menyimpan mikroba. Bentuk media ditentukan oleh ada tidaknya penambahan zat pematat seperti agar-agar, gelatin dan sebagainya, maka bentuk media dikenal tiga jenis yaitu :

1. Media padat

Media ditambah 12-15 gram tepung agar-agar per 1.000 ml media. Media yang memerlukan kadar air tinggi, maka jumlah tepung agar-agar harus rendah, tetapi untuk jenis media yang memerlukan kandungan air rendah penambahan tepung agar harus sedikit. Media padat umumnya dipergunakan untuk bakteri, ragi, jamur, dan kadang-kadang juga mikro alga.

2. Media cair

Media cair dapat digunakan untuk berbagai keperluan seperti pembiakan organisme dalam jumlah besar, fermentasi dan berbagai uji. Media padat biasanya digunakan untuk penampilan atau morfologi koloni serta mengisolasi biakan murni. Media setengah padat digunakan untuk menguji adanya motilitas dan kemampuan fermentasi (Suriawiria 1985).

3. Media semi cair atau padat

Penambahan zat pematat hanya 50% atau kurang dari yang seharusnya. Umumnya diperlukan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup aerobik atau fakultatif (Suriawiria 1985).

G. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang digunakan didalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu kehidupan dan proses yang sedang dikerjakan (Waluyo 2004).

Sterilisasi merupakan suatu tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah dan kering, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar-X, sinar α , sinar gamma, dan sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu penggunaan saringan atau filter untuk bahan yang akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi (Darmandi 2008).

H. Siprofloksasin

Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan kuinolon. Target utama pada bakteri Gram negatif adalah DNA girase. Kedua rantai DNA heliks harus dipisahkan untuk memungkinkan terjadinya replikasi atau transkripsi DNA. Pemisahan kedua untai tersebut akan menyebabkan terjadinya *supercoiling* (pembentukan gulungan DNA) positif yang berlebihan pada DNA tersebut (Goodman dan Gilman 2007). Siprofloksasin mempunyai daya antibakteri terhadap *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *H.Influenza*, *Providencia*, *Serratia*, *Salmonella*, *N. Pseudomonas*, *N. Gonorrhoeae*, *B. catarrhalis* dan *Yersinia enterocolitica* yang termasuk Gram negatif. Terhadap bakteri Gram positif, daya antibakterinya kurang baik (Syarif *et al.* 2007). Purba (2013) melaporkan siprofloksasin memiliki aktivitas paling optimal terhadap *P.*

aeruginosa. Siprofloksasin digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian aktivitas antibakteri.

I. Antibakteri

Antibakteri adalah suatu senyawa yang dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh kehidupan mikroorganisme (Jawetz *et al.* 2007). Beberapa istilah yang digunakan untuk menjelaskan proses pembasmian bakteri yaitu germisid, bakterisid, bakteriostatik, antiseptik, desinfektan (Dianasari 2009). Germisid adalah bahan yang dipakai untuk membasmi mikroorganisme dengan mematikan sel-sel vegetatif, tetapi tidak selalu mematikan bentuk spora. Bakterisid adalah bahan yang dipakai untuk mematikan bentuk-bentuk vegetatif bakteri.

Bakteriostatik adalah suatu bahan yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri tanpa mematikannya. Antiseptik adalah suatu bahan yang menghambat atau membunuh mikroorganisme dengan mencegah pertumbuhan atau menghambat aktivitas metabolisme, digunakan pada jaringan hidup. Desinfektan adalah bahan yang dipakai untuk membasmi bakteri dan mikroorganisme patogen tapi belum tentu beserta spora, digunakan pada benda mati (Pelezar & Chan 1988).

1. Mekanisme kerja antibakteri

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok, yaitu yang mengganggu metabolisme sel mikroba, yang menghambat sintesis dinding sel mikroba, yang merusak membran sel mikroba, yang menghambat sintesis protein sel mikroba, dan yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel mikroba (Ganiswara 2007).

1.1. Penghambatan metabolisme sel. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, kuman patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA) untuk kehidupannya. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional, sehingga kebutuhan asam folat tidak terpenuhi hal ini bisa menyebabkan bakteri mati. Antibakteri yang termasuk dalam

kelompok ini ialah sulfonamid, trimetoprim dan asam p-aminosalisilat (Ganiswara 2007).

1.2. Penghambatan sintesis dinding sel. Dinding sel bakteri terdiri atas polipeptidoglikan yaitu suatu kelompok polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukan atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, kerusakan dinding sel akan menyebabkan terjadinya lisis, yang merupakan dasar efek bakterisidal pada kuman yang peka. Obat yang termasuk dalam kelompok ini ialah penisilin, sefalosporin, vankomisin, basitrasin, dan sikloserin (Ganiswara 2007).

1.3. Penghambatan keutuhan membran sel. Selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, dapat meloloskan beberapa zat yang terlarut dan bahan zat-zat yang terlarut lainnya. Salah satu kerja antibakteri adalah mengubah tegangan permukaan sehingga merusak permeabilitas selektif dari membran sel mikroba. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain. Obat yang termasuk kelompok ini ialah polimiksin, golongan polien serat berbagai antimikroba kemoterapi seperti antiseptik (Ganiswara 2007).

1.4. Penghambatan sintesis protein. Sintesis protein berlangsung diribosom, dengan larutan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan berbagai cara antimikroba berikatan dengan komponen ribosom 30S dan menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan non fungsional bagi sel mikroba. Antibiotik berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Akibatnya, rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru. Obat yang termasuk kelompok ini ialah golongan aminoglikosida, makrolid, linkomisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol (Ganiswara 2007).

1.5. Penghambatan sintesis asam nukleat. Antimikroba berikatan dengan enzim polymerase-RNA (pada sub unit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Obat yang termasuk kelompok ini ialah rifampisin, dan golongan kuinolon (Ganiswara 2007).

2. Metode Difusi

Metode difusi yaitu dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat kemudian diinokulasi kedalam medium MHA dengan metode perataan dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan berdifusi kedalam media. Media tersebut diisi kertas cakram yang dijenuhkan dengan larutan uji pada konsentrasi tertentu kemudian diletakkan pada pembenihan padat yang sudah ditanami dengan biakan bakteri dan dilakukan pemeriksaan setelah pengeraman. Luas daerah hambatan jernih obat sekitar cakram dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan obat terhadap bakteri yang diperiksa (Harminta 2004).

3. Metode Dilusi

Metode dilusi dilakukan dengan mencampur secara homogen suatu obat dalam media dengan jumlah yang berbeda-beda atau membuat larutan obat dengan kadar yang berbeda-beda, masing-masing media ditambahkan suspensi kuman kemudian diinkubasi dan diamati daerah media yang jernih (Bonang & Koeswardono 1982). Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap pada media cair maupun padat. Media diinokulasikan terhadap bakteri uji, selanjutnya diinkubasi dan diamati konsentrasi antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji. Keuntungan metode ini adalah memberikan hasil kualitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al.* 2007).

J. Landasan Teori

Seseorang mudah terkena infeksi apabila terdapat luka pada kulit sehingga mudah terpapar bakteri patogen dari lingkungan sekitar. Salah satu bakteri patogen yang dapat menyebabkan infeksi pada kulit adalah bakteri *P. aeruginosa*

yang membuat adanya nanah biru-hijau pada luka yang didapat. *P. aeruginosa* termasuk dalam Gram negatif yang mempunyai flagel polar, ada juga yang mempunyai 2-3 flagel. *P. aeruginosa* juga tumbuh pada pembenihan tanpa sakarosa yang terdapat pada lapisan lendir polisakarida ekstraseluler, strain yang diisolasi dari bahan klinik sering mempunyai pili untuk perlekatan pada pemakaian sel dan memegang pengaruh penting dalam resistensi terhadap fagositosis. *P. aeruginosa* hanya patogen bila masuk ke dalam daerah-daerah pertahanan yang normalnya tidak ada atau bila berperan dalam infeksi campuran. Kuman ini menyebabkan infeksi luka dan luka bakar membentuk nanah yang berwarna biru-hijau (Jawetz *et al.* 2005).

Salah satu tanaman yang mempunyai khasiat untuk mengobati luka infeksi pada luka bakar berdasarkan empiris yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu tanaman yodium. Tanaman yodium adalah tinggi sekitar 2 meter, batang bulat, berkayu, pangkalnya membesar, bergetah. Daun yodium mempunyai lebar 2,5-4 cm, pertulangan menjari dan tepi rata. Berbunga majemuk berbentuk malai, bertangkai, tumbuh di ujung cabang, panjang sekitar 1,5 cm biji bulat, jika masih muda berwarna putih dan setelah itu menjadi coklat (Hariana 2013). Bagian daun yodium mengandung alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin (Syarfati *et al.* 2011). Daun yodium berkhasiat sebagai obat luka, bengkak, terkilir dan tulang patah. Efek farmakologi daun yodium diantaranya penurun panas serta anti inflamasi. (Depkes 2000; Hariana 2013).

Hasil uji fitokimia yang dilakukan oleh Aiyelaagbe *et al.* (2008) (dalam Sari & Shofi) diketahui bahwa dalam tanaman yodium mengandung saponin, steroid, glikosida dan tanin yang berbeda dari setiap bagian tanamannya. Menurut (Syarfati *et al.* 2011) daun yodium mengandung beberapa zat berkhasiat seperti seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin. Zat berkhasiat tersebut dapat berfungsi sebagai antibakteri. Menurut Juliantina *et al.* (2008) alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut.

Senyawa flavonoid merupakan golongan senyawa fenol, diduga mekanisme kerjanya dengan mendenaturasikan protein sel dan merusak membran sel bakteri. Suatu substansi yang dapat mendenaturasikan protein dan merusak sel tanpa dapat diperbaiki lagi (*irreversibel*) sehingga pertumbuhan bakteri terhambat (Gunawan & Mulyani 2004). Saponin merupakan senyawa metabolit sekunder, dapat berfungsi sebagai antibakteri (Marliana 2007). Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, antidiare, antibakteri dan antioksidan (Mulyani 2006).

Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi secara maserasi kemudian fraksinasi untuk memperoleh zat-zat aktif yang diperkirakan dapat berkhasiat sebagai antibakteri. Maserasi merupakan suatu penyarian zat aktif yang telah dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang sesuai selama lima hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya, cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan didalam sel dengan diluar sel (Armanto 2009). Fraksinasi adalah suatu cara memisahkan golongan utama, kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan polaritas (Harborne 1996).

Daun yodium di maserasi dengan etanol 70% sampai diperoleh ekstrak etanol. Ekstrak etanol selanjutnya di fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air untuk memisahkan senyawa berdasarkan polaritasnya, dimana fraksi *n*-heksana akan melarutkan kandungan senyawa tanaman yang bersifat nonpolar seperti minyak atsiri, steroid dan terpenoid, etil asetat melarutkan senyawa yang bersifat semipolar seperti flavonoid aglikon, dan air merupakan pelarut polar yang akan melarutkan senyawa polar seperti saponin dan tanin (Susilowati 2010).

Aktivitas antibakteri pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode difusi dan dilusi. Uji difusi adalah salah satu uji yang dapat dilakukan untuk mengetahui aktivitas dari suatu antibiotik terhadap bakteri uji. Uji difusi memberi hasil diameter zona hambat. Hasil penelitian menurut (Darmawi 2013) menunjukkan bahwa daya hambat getah jarak cina (*J. multifida*) terhadap *S. aureus* secara in vitro dengan nilai konsentrasi 50% zona hambat sebesar 13,5

mm, Sedangkan menurut (Maryati 2013) konsentrasi 100% diameter pada ekstrak sebesar 7,67 mm. Penelitian oleh Aiyelaagbe *et al.*, (2008) Konsentrasi Hambat Minimum terbaik dari ekstrak daun yodium adalah $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

K. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori, maka dapat disusun hipotesis dalam penelitian ini, yaitu :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun yodium mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, dari ketiga fraksi atau ekstrak etanol daun yodium yang mempunyai aktivitas antibakteri paling efektif terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 adalah etil asetat.

Ketiga, fraksi yang paling teraktif terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 mempunyai nilai KHM dan KBM.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun yodium (*J. multifida*) yang berasal dari tanaman yodium yang ditanam di Kelurahan Jatibarang, Brebes Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun yodium dari tanaman yodium (*J. multifida*) yang tanamannya tumbuh di pekarangan, diambil secara acak dari Kelurahan Jatibarang, Brebes Jawa Tengah pada bulan Januari 2017.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah variabel yang membuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama dalam penelitian ini adalah serbuk daun yodium (*J. multifida*) dibuat ekstrak pelarut etanol 70% dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol dengan metode maserasi, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun yodium terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan berdasarkan pola hubungan sebab akibat menjadi variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

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

Variabel terkendali merupakan variabel-variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar

hasil yang ditetapkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah *P. aeruginosa* ATCC 27853, media, suhu inkubasi, waktu inkubasi, kondisi laboratorium dan sterilisasi.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun yodium terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan melihat zona hambat pertumbuhan bakteri dan kekeruhan media uji.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun yodium (*J. multifida*) adalah daun dari tanaman yodium (*J. multifida*) yang diambil dari Kelurahan Jatibarang, Brebes Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun yodium adalah daun yodium yang diambil kemudian dibersihkan dari pengotor, dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 50 °C lalu dibender, kemudian diserbuk dan di ayak dengan ayakan no. 40.

Ketiga, ekstrak adalah hasil ekstraksi serbuk daun yodium (*J. multifida*) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% sampai kental yang kemudian dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 40 °C.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah ekstrak daun yodium didispersikan dengan pelarut etanol air kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat didapat dari residu ekstrak daun yodium dengan *n*-heksana yang kemudian difraksinasi dengan pelarut etil asetat.

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

Ketujuh, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *P. aeruginosa* ATCC 27853 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Kedelapan, aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dengan melihat zona hambat pertumbuhan bakteri dengan berbagai konsentrasi 50%; 25% dan 12,5%. Kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif antibiotik Siprofloksasin. Metode dilusi yaitu berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi dengan cara penapisan hingga konsentrasi akhir

sebagai berikut 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,5625%; 0,78125%; 0,390625%. Kontrol negatif adalah ekstrak/ fraksi dan kontrol positif suspensi bakteri.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1. Bahan dan sampel. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun yodium. Sampel bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

1.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, *n*-heksana, etil asetat, aquadest steril, asam sulfat pekat, asam asetat, dan Siprofloksasin.

1.3. Medium. Medium yang digunakan *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Kligler Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Citrat, Pseudomonas Selektif Agar* (PSA).

2. Alat

Beberapa macam alat yang digunakan dalam penelitian antara lain alat blender, botol maserasi, corong Buchner, oven dengan suhu rendah dan konstan, moisture balance, timbangan analitik, pipet volum, Alat gelas lain yang digunakan seperti labu Erlenmeyer, gelas ukur, batang pengaduk, tabung reaksi.

Alat aktivitas antibakteri digunakan adalah autoklaf, inkubator, kapas lidi steril, pinset, oven, pembakar spiritus, kasa, kaki tiga, pipet ukur, cawan petri, syringe, ose platina, gelas obyek.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun yodium (*J. multifida*) berdasarkan ciri-ciri morfologis yang ada pada daun yodium (*J. multifida*) yang dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistematika Tumbuhan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi ini bertujuan

untuk memastikan bahwa memang benar tanaman yang digunakan adalah daun yodium.

2. Persiapan bahan

Daun yodium (*J. multifida*) berasal dari Kelurahan Jatibarang, Brebes Jawa Tengah. Daun yang diambil dalam keadaan segar dari tanaman yodium. Daun dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran atau debu yang menempel, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50 °C sampai didapat daun yodium dengan kadar air tertentu. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, untuk menjamin dalam penyimpanan, mencegah pertumbuhan jamur dan mencegah proses atau reaksi enzimatika yang dapat menurunkan mutu.

3. Pengeringan daun yodium

Daun yodium yang sudah kering kemudian diserbukkan dengan cara diblender, diayak dengan menggunakan pengayak no. 40. Hasil penyerbukan disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat agar tidak terkena cemaran.

4. Penetapan kadar lembab serbuk daun yodium

Penetapan kadar lembab serbuk daun yodium dilakukan dengan alat *Moisture balance*. Caranya serbuk ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian dimasukkan ke dalam cawan yang ada di dalam alat *Moisture balance*, kemudian dibaca kandungan airnya dan ditunggu sampai alat menunjukkan hasil kadar dengan satuan %. Simplisia dalam bentuk serbuk, kadar lembab tidak lebih dari 10%. Penimbangan dilakukan sebanyak 3 kali hingga diperoleh berat yang konstan.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun yodium

Pembuatan ekstrak etanol dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk daun yodium dimasukkan ke dalam botol maserasi kemudian ditambah etanol 70%. Botol ditutup kemudian dikocok. Selanjutnya maserat disimpan pada suhu ruang dan dihindarkan dari cahaya matahari langsung selama 5 hari dan dilakukan pengocokan secara teratur.

Hasil perendaman tersebut disaring dengan kain flanel dan kertas saring sehingga diperoleh filtrat. Filtrat yang didapatkan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kental.

6. Penetapan persen rendemen

Persen rendemen diperoleh dari penimbangan hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk daun yodium kering dan dikalikan 100%

$$(\%) \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat serbuk daun yodium}}$$

7. Uji bebas etanol ekstrak daun yodium

Uji bebas etanol ekstrak daun yodium dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak daun yodium benar-benar bebas dari etanol. Ekstrak daun yodium diuji etanolnya dengan melakukan uji esterifikasi etanol menggunakan H₂SO₄ pekat (asam sulfat pekat) dan CH₃COOH (asam asetat) kemudian dipanaskan, hasil uji bebas etanol dalam ekstrak daun yodium ditandai dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol (Depkes 1977).

8. Pembuatan fraksi daun yodium

Fraksinasi dilakukan dengan cara ekstrak daun yodium didispersikan dengan pelarut etanol : air (1:5) sebanyak yang digunakan untuk mendispersikan, kemudian dilakukan fraksinasi 3 kali dengan pelarut *n*-heksana sebanyak yang digunakan untuk mendispersikan. Proses fraksinasi dilakukan dengan corong pisah, sampai membentuk dua lapisan cairan yang terpisah secara nyata, yaitu lapisan air di bagian bawah dan lapisan *n*-heksana di bagian atas. Fraksi *n*-heksana yang didapat di uapkan pelarutnya dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 40 °C. Residu yang didapat dari fraksi *n*-heksana dilanjutkan fraksinasi 3 kali dengan pelarut etil asetat sebanyak yang digunakan untuk mendispersikan sampai membentuk dua lapisan cairan yang terpisah secara nyata, yaitu lapisan air di bagian bawah dan lapisan etil asetat di bagian atas. Fraksi etil asetat dan air diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 40 °C.

9. Identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun yodium

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam daun yodium. Identifikasi kandungan senyawa yaitu alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin dibuktikan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

9.1. Identifikasi Alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara 0,5 g serbuk, ekstrak dan fraksi daun yodium ditambahkan 5 tetes HCl 2 N dipanaskan kemudian ditambah beberapa tetes pereaksi Mayer reaksi positif bila terbentuk endapan menggumpal berwarna putih/ kuning. Penambahan pereaksi Dragendrof terbentuk endapan merah sampai jingga menunjukkan adanya alkaloid (Alamsyah *et al.* 2014).

9.2. Identifikasi Flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara 0,5 g serbuk, ekstrak dan fraksi daun yodium ditambah serbuk Mg kemudian ditambah 5 ml HCl pekat reaksi positif menghasilkan warna kuning menunjukkan adanya flavonoid (Puspasari *et al.* 2014).

9.3. Identifikasi Saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan cara 0,5 g serbuk, ekstrak dan fraksi daun yodium ditambahkan air panas lalu dikocok kuat atau menggunakan vortex selama 10 detik. Reaksi positif bila penambahan HCl 2 N 2 tetes terbentuk busa stabil maka mengandung saponin (Puspasari *et al.* 2014).

9.4. Identifikasi Tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan cara 0,5 g serbuk, ekstrak dan fraksi daun yodium ditambahkan air panas lalu disaring, filtrat ditambah beberapa tetes FeCl_3 1% dihomogenkan hingga mengalami perubahan warna. Reaksi positif timbulnya warna coklat kehitaman/ biru kehitaman (Alamsyah *et al.* 2014).

10. Sterilisasi alat dan bahan

Seluruh alat dan bahan yang akan digunakan dilakukan pencucian hingga bersih dan dilanjutkan pengeringan. Langkah selanjutnya dilakukan pensterilan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, begitu juga media yang digunakan. Sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanas api langsung.

11. Identifikasi bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853

11.1. Identifikasi bakteri secara goresan. Identifikasi bakteri uji *P. aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan diinokulasi secara perataan pada media PSA dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Penampakan membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen berwarna kehijauan (Jawetz *et al* 2007).

11.2. Identifikasi *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode pengecatan. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui struktur dan morfologi dari bakteri. Identifikasi yang dilakukan selanjutnya adalah pengecatan Gram. Bakteri yang dicurigai *P. aeruginosa* ATCC 27853 pada pengamatan koloni, diambil satu ose kemudian dioleskan pada obyek glass. Smear pada objek glass kemudian ditetesi dengan Gram A (larutan kristal violet) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram B (*lugol's iodine*) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram C (etanol 70%) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram D (safranin) diamkan ± 1 menit kemudian dibilas. Objek glass yang telah dilakukan pengecatan dilihat di mikroskop (Sufardin 2016). Hasil bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 digolongkan dalam bakteri Gram negatif dengan warna sel merah.

11.3. Identifikasi biokimia *P. aeruginosa* ATCC 27853. Bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 dapat diketahui sifat fisiologisnya dengan inokulasi pada media uji biokimia. Macam media yang digunakan inokulasi bakteri uji *P. aeruginosa* ATCC 27853 adalah SIM (*Sulfida Indol Motility*), KIA (*Klinger Iron Motility*), LIA (*Lisin Iron Agar*), Citrat. Masing-masing media tersebut diinokulasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Hasilnya dapat diketahui dengan perubahan warna masing-masing media atau penambahan reagen.

Media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri. Cara identifikasi dengan biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Hasil uji sulfida (-) untuk *P. aeruginosa* ATCC 27853, yaitu tidak terdapat warna hitam pada media, uji indol (-) yaitu terbentuk warna merah pada bagian atasnya setelah ditambahkan dengan

reagen Erlich, uji motilitas (+) yaitu pertumbuhan bakteri yang menyebar pada media.

Media KIA (*Klinger Iron Motility*). Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Cara identifikasi dengan biakan bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan dengan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C. Hasil K/KS- untuk *P. aeruginosa* ATCC 27853 adalah bagian lereng berwarna merah ditulis K, bagian dasar berwarna merah ditulis K, sulfida negatif yaitu tidak terbentuk warna hitam pada media yang ditulis S-.

Media LIA (*Lisin Iron Agar*). Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi dari hasil sulfida. Cara identifikasi dengan biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Hasil K/KS- untuk *P. aeruginosa* ATCC 27853 yaitu lereng akan berwarna ungu ditulis K, dasar berwarna ungu ditulis K, dan sulfida negatif yaitu tidak terbentuknya warna hitam pada media ditulis S-.

Media Citrat. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Cara identifikasi yaitu dengan biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Hasil positif (+) untuk *P. aeruginosa* ATCC 27853 yaitu media berwarna hijau berubah menjadi warna biru (Power & Mc Cuen 1988).

12. Pembuatan suspensi bakteri uji

Biakan murni *P. aeruginosa* ATCC 27853 diambil dengan jarum ose steril. Kemudian dimasukkan secara aseptis kedalam tabung reaksi steril yang telah berisi media BHI (*Brain Heart Infusion*) cair yang kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan modifikasi Mc farland 0,5, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam.

13. Aktivitas antibakteri dengan metode Difusi

Ekstrak etanol hasil maserasi dan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun yodium yang didapatkan diuji secara mikrobiologi dengan bakteri uji *P.*

aeruginosa ATCC 27853. Pengujian aktivitas antibakteri daun yodium dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi. Metode yang digunakan adalah metode difusi. Metode difusi digunakan untuk menentukan luas zona diameter hambat terhadap bakteri uji. Metode ini mempunyai keuntungan dibandingkan metode yang lain yaitu lebih ekonomis, sederhana dan mudah dibuat.

Metode difusi dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat dan ditekan-tekan pada ujung tabung, kemudian diinokulasikan ke dalam medium MHA dengan metode perataan (*Spread Plate Method*) dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Pada media tersebut diisi kertas cakram ukuran 6 mm menggunakan pinset dengan jarak yang sama. Masing-masing kertas cakram yang sudah diberi agen antimikroba sesuai konsentrasi. Yang berisi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air. Siprofloksasin sebagai kontrol positif dan pelarut DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Konsentrasi ekstrak dan fraksi masing-masing dibuat 50%, 25% dan 12,5%. Media yang telah berisi kertas cakram dimasukkan ke dalam inkubator dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C dan diamati hasilnya, setelah itu diukur diameter zona hambat sekitar kertas cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram menandakan bahwa kandungan kimia daun yodium memiliki daya hambat terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

14. Aktivitas antibakteri dengan metode Dilusi

Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 10 tabung steril. Pembuatan larutan stok fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air menggunakan pelarut DMSO 5%, masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa konsentrasi pengenceran yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,5625%; 0,78125%; 0,390625%. Medium BHI dimasukkan 0,5 ml ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptis, tabung pertama ditambahkan 0,5 ml fraksi lalu dikocok kemudian dari tabung pertama diambil 0,5 ml dimasukkan kedalam tabung kedua, dan dari tabung kedua diambil 0,5 ml dimasukkan kedalam tabung ketiga dan begitu seterusnya sampai tabung kesepuluh. Suspensi bakteri dalam medium BHI

dimasukkan kedalam tiap-tiap tabung uji sebanyak 0,5 ml. Ekstrak/ fraksi teraktif sebagai kontrol negatif, suspensi *P. aeruginosa* sebagai kontrol positif dan siprofloksasin sebagai kontrol pembanding, Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 18-24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Menentukan KHM yaitu batas terendah tabung media yang jernih atau yang memberikan hasil negatif. Kemudian menentukan KBM dengan cara menginokulasi sediaan dari tabung uji pada media PSA dalam cawan petri dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media PSA yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

15. Identifikasi kandungan kimia fraksi paling aktif secara KLT

Fraksi yang paling aktif diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi yang dinyatakan paling aktif ditotolkan menggunakan pipa kapiler di atas lempeng kromatografi kemudian dielusikan dengan jarak pengembang 8 cm. KLT mula-mula dilakukan penjenuhan dengan uap fase gerak yang sesuai di dalam suatu bejana (*chamber*) yang dindingnya telah dilapisi dengan kertas saring. Sehingga atmosfer di dalam bejana jenuh dengan fase gerak kemudian dilakukan elusi sampai fase gerak mencapai batas elusi. Setelah pengembangan, lempeng kromatografi lapis tipis dikeringkan, dilakukan deteksi di bawah sinar UV dan pereaksi lainnya. Bercak yang terdeteksi ditentukan harga R_f dan penampakan warnanya.

14.1. Identifikasi Alkaloid. Identifikasi senyawa alkaloid dengan menggunakan KLT yaitu, fase diam silika gel GF 254 dan fase geraknya menggunakan toluene : etil asetat : dietilamin (7:2:1). Dideteksi di bawah sinar UV 254 berwarna coklat kehitaman dan UV 366 berwarna biru. Pereaksi semprot yang digunakan dragendrof menghasilkan warna jingga sampai merah tua (Harborne 1987).

14.2. Identifikasi Flavonoid. Flavonoid diidentifikasi secara kromatografi lapis tipis pada fase diam selulosa dan dielusikan dengan fase gerak BAA yaitu butanol : asam asetat : air (4:1:5). Bercak yang terjadi diamati di bawah lampu UV 254 nm berwarna meredam dan 366 nm berwarna biru, untuk memperjelas warna bercak disemprot dengan sitroborat. Hasil positif mengandung flavonoid jika menunjukkan warna bercak kuning (Marliana 2007).

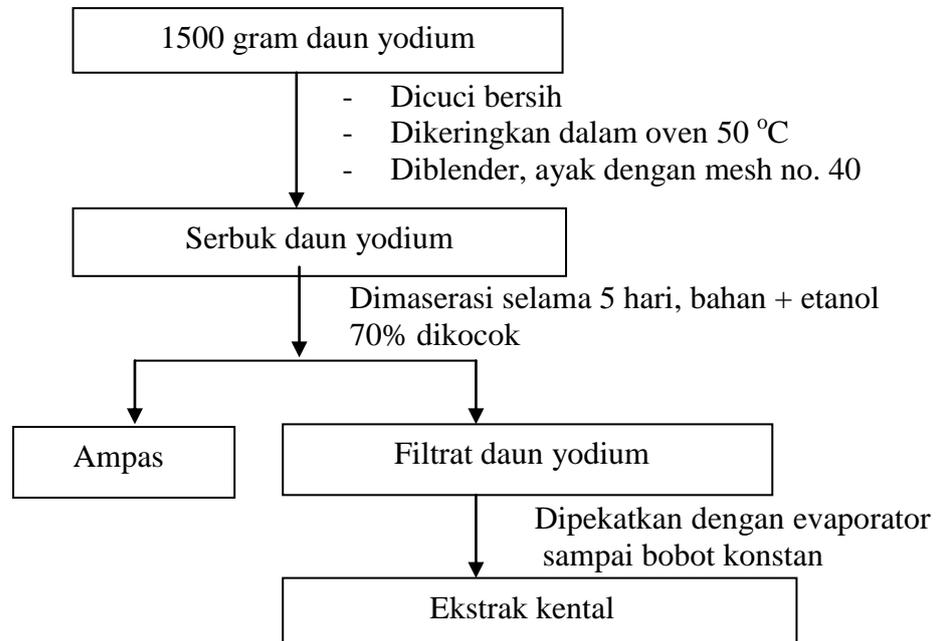
14.3. Identifikasi Saponin. Untuk mengetahui adanya senyawa saponin maka dilakukan identifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam silika gel GF 254 dan fase geraknya kloroform : metanol : air (6 : 3 : 1). Di deteksi di bawah sinar UV 254 berwarna kuning dan di bawah sinar UV 366 nm berwarna hijau. Pereaksi semprot anisaldehyd dengan hasil berwarna ungu dan di bawah bercak sinar biasa berwarna biru (Harborne 1987).

14.4. Identifikasi Tanin. Untuk mengetahui adanya tanin maka perlu dilakukan identifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana : etil asetat (3 : 7). Dideteksi di bawah sinar UV 254 berwarna gelap dan UV 366 biru hitam. Pereaksi semprot yang digunakan FeCl₃ 1% menghasilkan warna kuning (Robinson 1995).

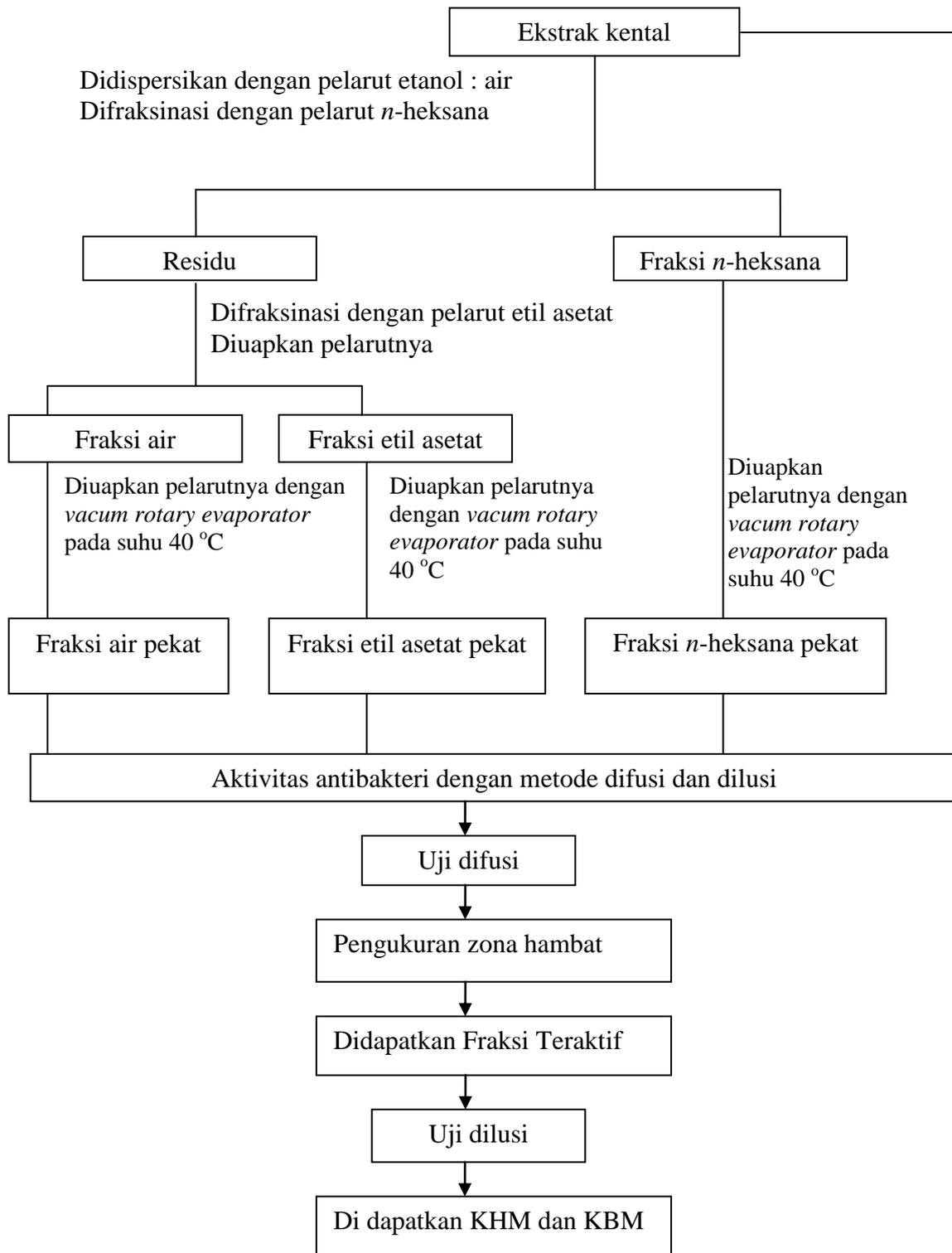
E. Analisis Hasil

Data yang diperoleh dari pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun yodium (*J. multifida*), terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode difusi selanjutnya diuji secara statistik menggunakan analisis of varian (ANOVA) dua jalan.

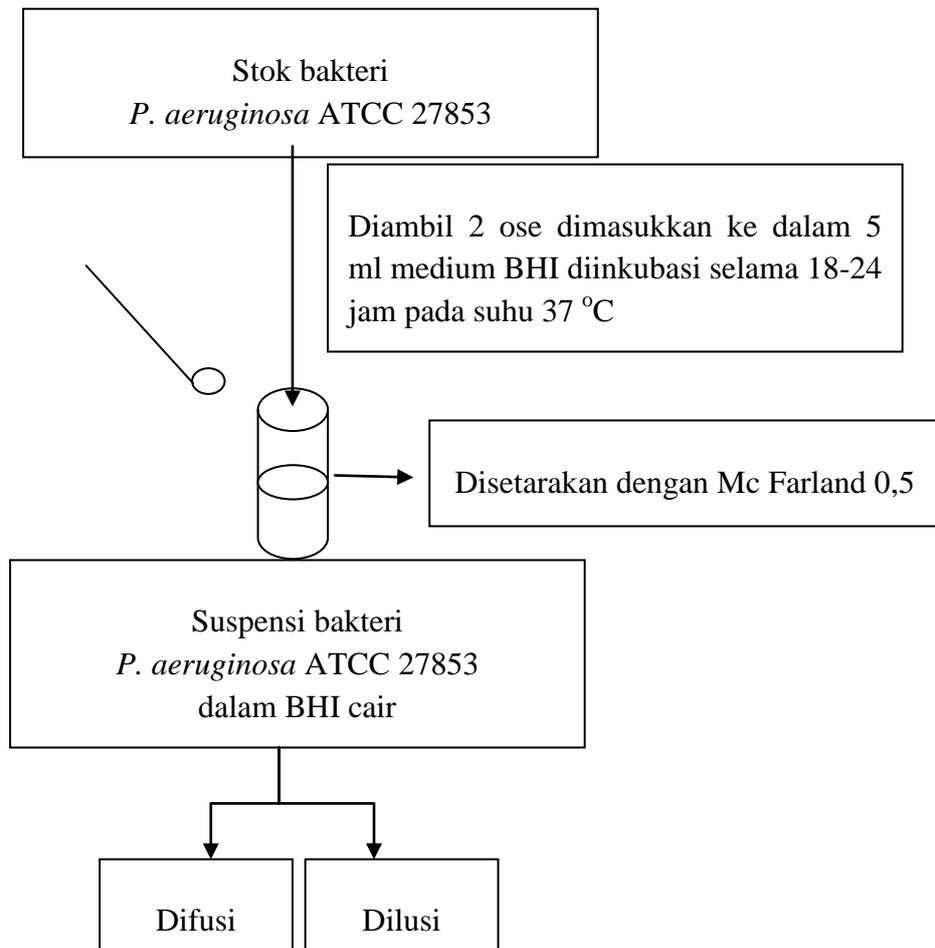
F. Skema cara kerja



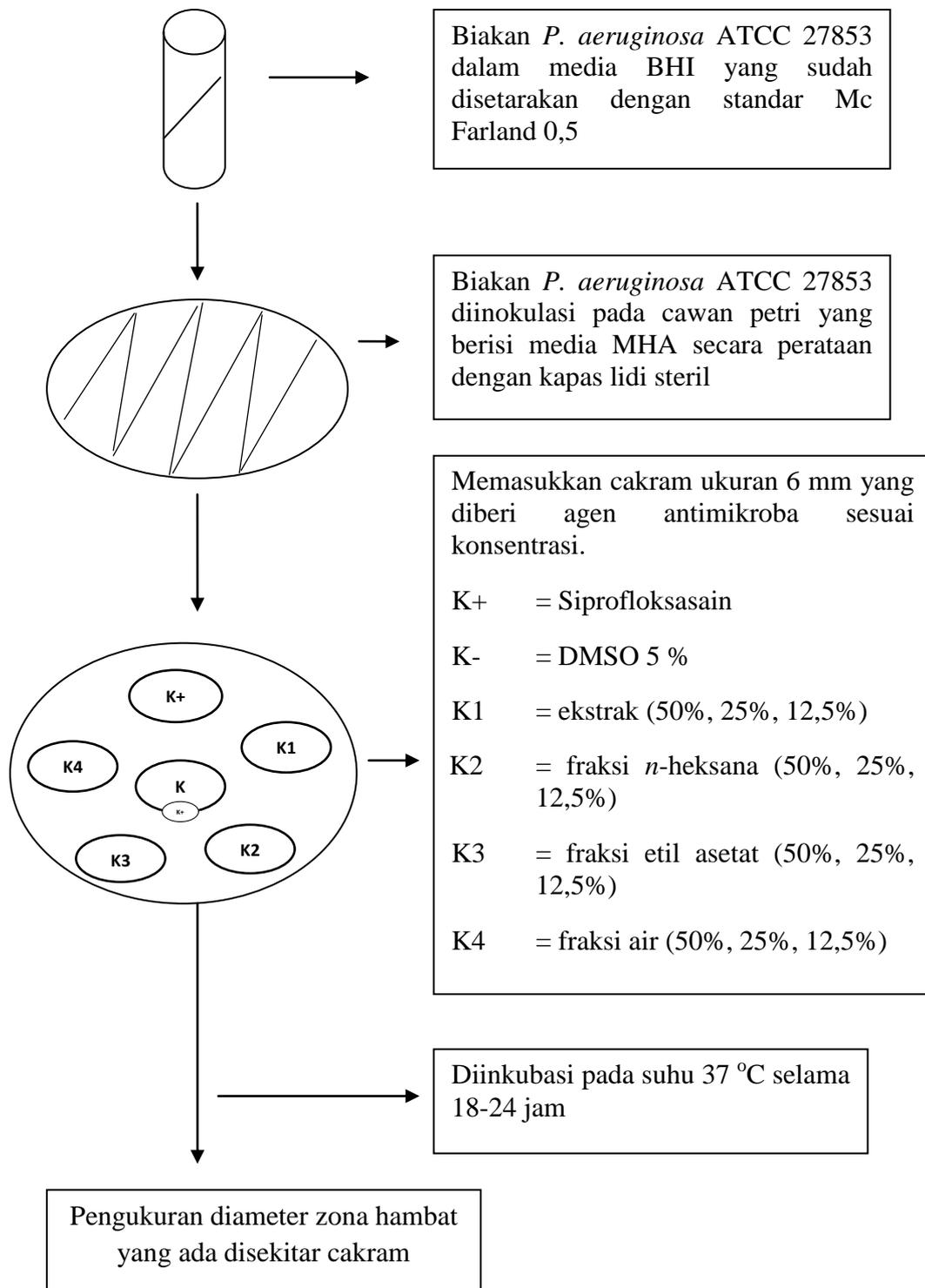
Gambar 2. Skema diagram kerja ekstraksi daun yodium secara maserasi



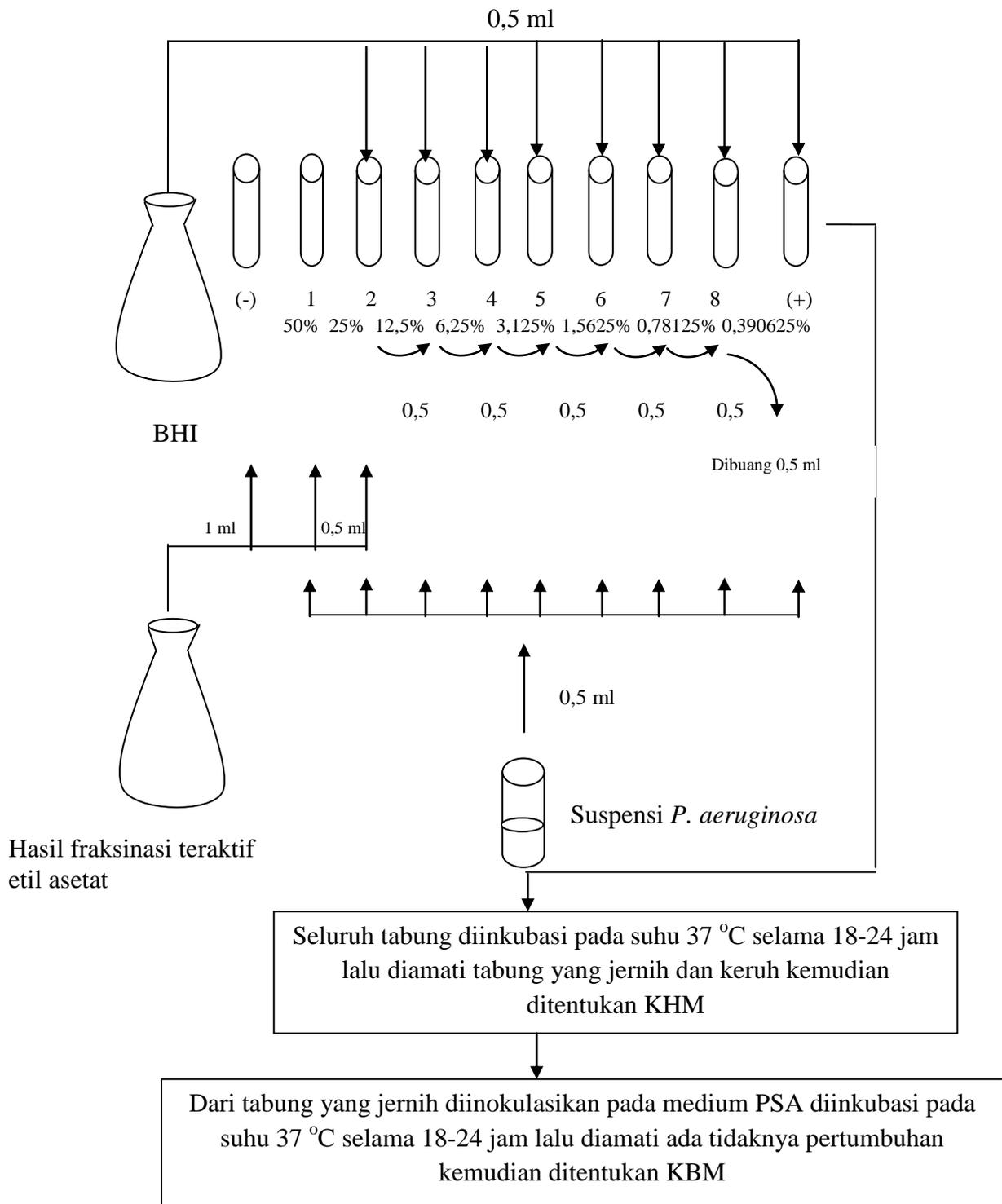
Gambar 3. Skema pembuatan fraksi



Gambar 4. Skema pembuatan suspensi



Gambar 5. Skema kerja aktivitas antibakteri dengan metode Difusi



Gambar 6. Skema kerja aktivitas antibakteri fraksi daun yodium terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode Dilusi

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian dan Pembahasan

1. Determinasi tanaman yodium (*J. multifida*)

Determinasi dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui tanaman yang akan diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari kemungkinan tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Berdasarkan hasil identifikasi dari Laboratorium Morfologi dan Sistematika Tumbuhan Universitas Setia Budi, hasil identifikasi maka tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun yodium, jenis *Jatropha multifida* L suku Euphorbiaceae (Backer 1965). Hasil dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pengambilan bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun yodium (*J. multifida*). Diambil secara acak dalam keadaan segar dari tanaman yodium yang masih muda, hal ini dikarenakan tingkat metabolisemenya masih tinggi sehingga zat aktif yang terkandung didalamnya cukup besar (Hasibuan 2016). Pengambilan daun dilakukan pada saat cuaca kering, apabila dilakukan pada saat hujan cuaca basah akan menurunkan mutu selama pengeringan (Koesenmardiyah 2000). Daun yodium yang diperoleh dari Kelurahan Jatibarang, Brebes Jawa Tengah pada bulan Januari 2017.

3. Pengeringan daun yodium

Daun yodium (*J. multifida*) dikeringkan dalam oven pada suhu 50 °C. Daun yang sudah kering diserbuk menggunakan blender, tujuannya untuk memperbesar luas permukaan kontak antara daun yodium dengan penyari, sehingga golongan senyawa yang terdapat dalam serbuk daun yodium dapat tersari sempurna. Kemudian diayak dengan ayakan mesh 40. Mesh 40 memiliki arti terdapat 40 lubang pada bidang jaring seluas 1 inchi. Pemakaian ayakan mesh 40 bertujuan agar serbuk daun yodium dapat tersaring secara optimal.

Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah daun yodium (*J. multifida*) dapat dilihat pada tabel 1. Pengeringan daun yodium (*J. multifida*) dilakukan sebanyak 5000 gram bobot basah kemudian dikeringkan dan didapat

bobot kering 1700 gram, diperoleh rendemen bobot kering terhadap bobot basah adalah 34 % ($\frac{b}{b}$). Perhitungan persentase bobot basah terhadap bobot kering dapat dilihat pada lampiran 12.

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun yodium

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (% b/b)
5000	1700	34 %

4. Penetapan kadar lembab serbuk daun yodium

Penetapan kadar lembab serbuk daun yodium (*J. multifida*) dihitung menggunakan alat *moisture balance*. Pemilihan alat *moisture balance* karena mempunyai tingkat keakurasian sampai 0,01% dengan hanya menggunakan sampel diatas 0,05 gram sampai 10 gram. Tujuan dilakukannya penetapan kadar lembab pada serbuk untuk mengetahui batasan maksimal besarnya kandungan air dalam bahan (Depkes 2000). Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun yodium (*J. multifida*) dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab menggunakan alat *moisture balance*

No	Bobot serbuk (gram)	Kadar lembab (%)
1	2,00	4,5
2	2,00	4,0
3	2,00	4,5
	Rata-rata	4,33

Berdasarkan tabel 2 hasil perhitungan kadar lembab serbuk daun yodium (*J. multifida*) yang dilakukan 3 kali replikasi, didapatkan persentase kadar lembab 4,33%. Penetapan kadar lembab tidak boleh lebih dari 10%. Kadar lembab yang kurang dari 10% dapat mencegah pertumbuhan kapang dan aktivitas enzim sehingga bahan lebih awet dan kandungan zat aktifnya tidak berkurang (Katno *et al.* 2008). Berdasarkan dari penetapan kadar lembab dapat dikatakan serbuk daun yodium ini memenuhi syarat karena persentase kadar lembab serbuk daun yodium kurang dari 10%. Perhitungan penetapan kadar lembab dapat dilihat pada lampiran 13.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun yodium

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan menggunakan etanol 70%. Etanol 70% dipilih karena pelarut bersifat netral terhadap senyawa

yang terkandung dalam simplisia dan mampu mencegah timbulnya jamur dan bakteri (Ansel 1989). Maserasi merupakan metode ekstraksi sederhana karena pengerjaannya relatif mudah dan sering digunakan dalam proses penyarian untuk senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan (Tiwari *et al.* 2011).

Daun yodium direndam dalam botol coklat dengan tujuan mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna. Etanol 70% yang dimasukkan ke dalam botol coklat yang telah tercampur dengan serbuk daun yodium harus segera ditutup agar pelarut tidak menguap, kemudian didiamkan selama 5 hari dengan sesekali digojog. Penggojokan bertujuan agar pelarut menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel, zat aktif dalam rongga sel karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel, maka larutan dengan konsentrasi lebih tinggi akan terdesak keluar. Peristiwa ini berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi di dalam dan di luar sel (Hargono 1986). Pemekatan dilakukan dengan *rotary evaporator* yang bertujuan agar senyawa yang ada dalam daun yodium tidak mudah rusak. Data hasil pembuatan ekstrak daun yodium dapat dilihat pada tabel 3 dibawah ini.

Tabel 3. Persentase bobot ekstrak maserasi daun yodium

Serbuk (gram)	Ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
1500	700	46,67

Persentase rendemen ekstrak maserasi daun yodium perlu dilakukan untuk membandingkan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (Depkes 2000). Hasil rendemen ekstrak yang diperoleh sebanyak 46,67 % artinya Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan nilai ekstrak maserasi yang dihasilkan semakin banyak. Hal ini kemungkinan pada saat proses penyaringan menggunakan alat corong Buchner serbuk masih ikut tersaring. Hasil perhitungan ekstrak daun yodium dapat dilihat pada lampiran 14.

6. Pengujian ekstrak daun yodium bebas etanol

Ekstrak daun yodium (*J. multifida*) dilakukan tes esterifikasi etanol. Hasil esterifikasi etanol dalam ekstrak daun yodium (*J. multifida*) dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi daun yodium (*J. multifida*)

Hasil	Pustaka
Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol	Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol (Depkes 1977).

Hasil tes bebas etanol pada tabel 4 menunjukkan bahwa ekstrak daun yodium (*J. multifida*) sudah terbebas dari pelarutnya yaitu etanol 70% yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas etanol. Uji bebas etanol bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri dari ekstrak daun yodium (Depkes 1977).

7. Fraksinasi ekstrak daun yodium

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama lain. Setiap pelarut akan secara selektif memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari dengan pelarut yang semipolar dan yang terakhir dengan pelarut yang polar (Harborne 1987).

Penyarian dilakukan dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pelarut etanol 70% merupakan bahan pelarut dengan campuran 70% etanol dan 30% air yang menghasilkan bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengotor hanya dalam skala kecil turut dalam cairan pengekstrasi.

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 pelarut masing – masing maka akan mudah diperkirakan bahan aktif yang dapat digunakan sebagai antibakteri.

7.1. Fraksi *n*- heksana. Hasil sediaan ekstrak maserasi yang telah dipekatkan ditimbang 10 gram. Proses fraksinasi dilakukan mengacu pada metode Windarwati (2011) yaitu proses partisi menggunakan pelarut etanol-air perbandingan (1:5) kemudian dilarutkan dengan 10 ml etanol dan 50 ml aquadest dalam beaker glass lalu dipisahkan di corong pisah dengan menambahkan *n*-heksana 60 ml difraksinasi sampai terbentuk dua lapisan, sehingga didapat fraksi *n*-heksana. Fraksi *n*-heksana berada dibagian atas dan air berada dibagian bawah

yang disebabkan karena berat jenis air lebih besar. Residu yang didapat dilakukan ekstraksi lanjutan dengan pelarut etil asetat. Berikut ini adalah rendemen hasil fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Rendemen fraksi *n*-heksana daun yodium

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen %
120	1,85	1,54

Perhitungan persentase rendemen fraksi *n*-heksana daun yodium didapat prosentase 1,54 %. Hasil fraksi *n*-heksana yang didapatkan sedikit dikarenakan pada waktu fraksinasi terjadi 3 lapisan yaitu fase air, fase *n*-heksana dan fase yang belum terpisah. Fase yang belum terpisah ditampung di wadah tersendiri sehingga kemungkinan besar zat aktif yang terkandung dalam fraksi *n*-heksana hilang. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana daun yodium dapat dilihat pada lampiran 14.

7.2. Fraksi etil asetat dan air. Residu dari fraksi *n*-heksana dipisahkan di corong pisah dengan menambahkan etil asetat 60 ml, sehingga didapat fraksi etil asetat dan air. Berikut ini adalah rendemen hasil fraksinasi etil asetat dan hasil fraksinasi air dapat dilihat pada tabel 6 dan 7.

Tabel 6. Rendemen fraksi etil asetat daun yodium

Bobot ekstrak etanol (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen %
120	6,32	5,26

Perhitungan persentase rendemen fraksi etil asetat daun yodium didapat 5,26 %. Hasil perhitungan rendemen fraksi etil asetat daun yodium dapat dilihat pada lampiran 14.

Tabel 7. Rendemen fraksi air daun yodium

Bobot ekstrak etanol (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen %
120	23,36	19,46

Perhitungan persentase rendemen fraksi air daun yodium didapat persentase 19,46 %. Hasil perhitungan rendemen fraksi air daun yodium dapat dilihat pada lampiran 14.

Hasil fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibanding fraksi yang lain karena mungkin sebagian besar senyawa dalam daun yodium bersifat polar.

Rendemen setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun yodium berbeda. Hasil rendemen yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu 100% atau mendekati 100%.

8. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun yodium

Hasil identifikasi kimia kandungan senyawa serbuk dan ekstrak etanol daun yodium (*J. multifida*) dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil identifikasi kimia serbuk dan ekstrak daun yodium

Senyawa	Pustaka	Interpretasi hasil	
		Serbuk	Ekstrak
Alkaloid	Reaksi positif ditandai dengan terbentuk endapan menggumpal warna putih/ kuning pada reagen Mayer dan endapan merah sampai jingga pada reagen Dragendrof (Alamsyah <i>et al.</i> 2014)	+	+
Flavonoid	Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Puspasari <i>et al.</i> 2014)	+	+
Saponin	Reaksi positif ditandai dengan terbentuk busa yang stabil + 2 tetes HCl 2N busa tidak hilang (Puspasari <i>et al.</i> 2014)	+	+
Tanin	Reaksi positif ditandai dengan terbentuk warna coklat kehitaman/ biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Alamsyah <i>et al.</i> 2014)	+	+

Keterangan : + : memiliki senyawa
- : tidak memiliki senyawa

Identifikasi kandungan kimia terhadap serbuk dan ekstrak etanol daun yodium (*J. multifida*) dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam daun yodium. Berdasarkan hasil identifikasi tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa dalam serbuk maupun ekstrak memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin, dimana senyawa tersebut memiliki aktivitas antibakteri.

Uji alkaloid menggunakan reagen Mayer dan Dragendroff. Prinsip metode ini adalah reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya penggantian ligan (Sangi *et al.*, 2012). Hasil uji Mayer menghasilkan endapan putih karena nitrogen alkaloid bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid (Marliana *et al.* 2005). Hasil uji Dragendroff menghasilkan endapan jingga karena nitrogen membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ ion logam (Marliana *et al.* 2005). Uji flavonoid diperoleh hasil positif reaksi memberikan perubahan warna kuning, disebabkan

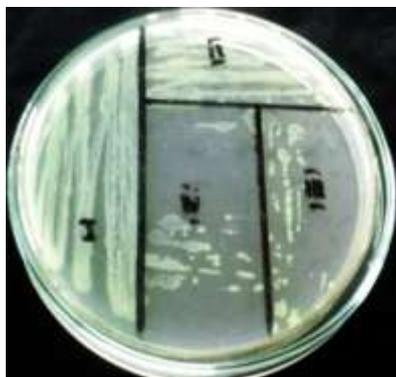
karena flavonoid memiliki ikatan dengan gugus gula yang menyebabkan flavonoid bersifat polar (Markham 1988).

Uji saponin diperoleh hasil positif disebabkan karena saponin mempunyai gugus hidrofilik dan hidrofob, saat digojog gugus hidrofilik akan berikatan dengan air sedangkan gugus hidrofob akan berikatan dengan udara sehingga membentuk buih. Penambahan asam berguna untuk menambah kepolaran sehingga gugus hidrofil akan berikatan lebih stabil dan buih yang terbentuk menjadi stabil (Saifudin 2015). Uji tanin diperoleh hasil positif, reaksi memberikan perubahan warna berupa coklat kehitaman. Perubahan warna terbentuk karena terjadi kompleks dengan ion Fe^{3+} (Saifudin 2015).

9. Identifikasi bakteri uji dan identifikasi uji biokimia

11.1. Hasil identifikasi *P. aeruginosa* ATTC 27853 secara goresan.

Identifikasi *P. aeruginosa* ATTC 27853 diinokulasikan pada media PSA selama 18-24 jam pada suhu 37 °C. *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan morfologi koloninya bulat halus dengan membentuk pigmen berwarna kehijauan karena menghasilkan enzim piocianin. Gambar hasil inokulasi dilihat pada lampiran 6.



Keterangan :

1. Daerah I mula-mula untuk meletakkan sampel.
2. Daerah II merupakan pengenceran pertama yang diambil dari ujung daerah I.
3. Daerah III merupakan pengenceran kedua yang diambil dari ujung daerah II.
4. Daerah IV merupakan pengenceran terakhir.

Gambar 3. Hasil identifikasi bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 secara inokulasi

11.2. Identifikasi bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan pengecatan Gram. Hasil identifikasi *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan pengecatan Gram adalah sel berbentuk batang susunan tersebar, berwarna merah muda dikarenakan rusaknya lapisan lipopolisakarida pada dinding sel sehingga pewarna primer kristal violet yang telah membentuk kompleks dengan iodine bisa dicuci dengan air (Pratiwi 2008). Hasil pengecatan Gram dapat dilihat dilampiran 6.

11.3. Identifikasi bakteri uji secara biokimia.

Tabel 9. Hasil identifikasi uji biokimia pada bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853

Pengujian	Hasil	Pustaka
SIM	- + +	- + +
KIA	K/KS ⁻	K/KS ⁻
LIA	K/KS ⁻	K/KS
Citrat	+	+

Keterangan :

SIM = *Sulfida Indol Motillity*

KIA = *Kliger Iron Agar*

LIA = *Lysin Iron Agar*

+ = Reaksi positif

- = Reaksi negatif

A = Acid (asam)

K = Alkali (basa)

S = Sulfida

G = Gas

N = Netral

Hasil pengujian SIM menunjukkan sulfida (-) karena medium kuning, indol (+) karena terbentuk cincin merah pada media setelah ditambah reagen Erlich A dan Erlich B masing-masing 3 tetes. Hal ini terjadi karena pemecahan asam amino triptopan oleh enzim triptopanase menjadi indol dan asam piruvat. Hasil ini menunjukkan bahwa *P. aeruginosa* ATCC 27853 memakai triptopan sebagai salah satu sumber karbon sehingga terjadi reaksi antara indol dan paradimetil amino dan bensaldehid yang akan membentuk rosindol yang berwarna merah. Uji motilitas (+) karena pertumbuhan bakteri yang menyebar, yang berarti bahwa *P. aeruginosa* ATCC 27853 memiliki flagel (Arifani 2016).

Hasil pada medium KIA bagian lereng berwarna merah (K), bagian dasar berwarna merah (K) yang menunjukkan bahwa bakteri tidak memfermentasi glukosa dan laktosa, sulfida negatif karena tidak terbentuk warna hitam pada media, karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan metion yang akan menghasilkan H₂S. H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam. Medium KIA mengandung 1% laktosa, 0,1% glukosa dan phenol red sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam. Medium KIA juga mengandung sodium thiosulfate untuk menghasilkan H₂S (Arifani 2016).

Hasil pada medium LIA menunjukkan lereng berwarna ungu (K), bagian dasar berwarna ungu (K) hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa sehingga

berwarna ungu diseluruh media. Hal ini disebabkan oleh media mengandung bromkresol ungu yang akan mengubah warna coklat menjadi warna ungu. Sulfida negatif yaitu tidak terbentuknya warna hitam pada media dikarenakan *P. aeruginosa* ATCC 27853 tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan metion yang akan menghasilkan H₂S. H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam pada media (Arifani 2016)

Hasil pada medium Sitrat positif berwarna biru, artinya *P. aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan Sitrat sebagai sumber tunggal maka menyebabkan suasana menjadi basa sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru karena pada medium Sitrat terdapat indikator BTB (Bromo Thymol Blue) yang merupakan indikator pH (Arifani 2016). Hasil pengujian biokimia dapat dilihat di lampiran 6.

10. Pengujian antibakteri daun yodium secara difusi

Fraksi yang didapatkan dari ekstrak daun yodium (*J. multifida*) yaitu fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853. Masing-masing sediaan dibuat dalam tiga konsentrasi yaitu 50 %, 25 % dan 12,5 %. Kontrol positif yang digunakan adalah Siprofloksasin, dimana siprofloksasin merupakan antibiotik golongan florokuinolon yang penting untuk terapi infeksi yang disebabkan *P. aeruginosa* dan memiliki mekanisme kerja dengan cara menghambat DNA girase dan topoisomerase IV yang keduanya merupakan enzim yang penting untuk replikasi DNA bakteri. Kontrol positif berfungsi sebagai pembanding terhadap aktivitas antimikroba ekstrak maupun fraksi karena antibiotik merupakan senyawa antimikroba yang telah dibuat secara standart (Reapinam 2007). Kontrol negatif menggunakan DMSO 5%, berfungsi untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pelarut terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 sehingga dapat diketahui bahwa yang mempunyai aktivitas antibakteri adalah zat uji bukan pelarut. Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Katrin *et al.* (2015) menyatakan bahwa pelarut DMSO 10% tidak memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri. Selain itu, hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Reapinam (2007) yang menyatakan bahwa hasil diameter penghambatan DMSO terhadap bakteri-bakterinya adalah nol, sehingga pelarut ini merupakan pelarut

yang baik karena tidak memberikan pengaruh dalam aktivitas penghambatan bakteri.

Metode difusi pada pengujian aktivitas antibakteri dipilih karena cepat, mudah dan sederhana dalam pengerjaannya. Prinsip dari metode ini adalah kapas lidi steril dimasukkan ke dalam tabung yang berisi suspensi bakteri yang sebelumnya telah disesuaikan dengan kekeruhan modifikasi standart Mc farland 0,5 kemudian kapas lidi steril tersebut di tekan-tekan pada ujung tabung dan digoreskan merata pada media MHA. Kertas cakram yang sebelumnya telah direndam ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% diletakkan diatas media MHA yang telah mengandung bakteri uji dan sedikit ditekan. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam (Depkes 1991). Diameter daerah hambat diamati dan dihitung menggunakan penggaris yang dinyatakan dalam satuan mm.

Tabel 10. Diameter hambat pada uji antibakteri daun yodium terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 secara difusi

Sampel	Konsentrasi	Diameter Hambat (mm)			
		Replikasi			Rata – rata
		1	2	3	
<i>n</i> -heksana	50%	10,7	10,3	10,3	10,4 ± 0,23
etil asetat	50%	16,0	13,6	14,3	14,7 ± 1,23
air	50%	12,7	14,0	12,7	13,1 ± 0,75
ekstrak	50%	11,5	12,0	12,0	11,8 ± 0,28
<i>n</i> -heksana	25%	9,3	9,7	9,7	9,5 ± 0,23
etil asetat	25%	14,0	15,3	14,0	14,4 ± 0,75
air	25%	12,6	13,0	12,6	12,7 ± 0,23
ekstrak	25%	11,6	12,0	11,6	11,7 ± 0,23
<i>n</i> -heksana	12,5%	8,0	8,7	8,0	8,2 ± 0,40
etil asetat	12,5%	12,0	12,0	11,3	11,7 ± 0,40
air	12,5%	8,7	9,0	8,7	8,8 ± 0,17
ekstrak	12,5%	9,0	9,0	8,7	8,9 ± 0,17
Kontrol (+)		27,0	27,0	28,0	27,3 ± 0,57
Kontrol (-)		0	0	0	0

Keterangan : Kontrol (+) : Siprofloksasin
Kontrol (-) : DMSO 5%

Hasil pengujian diatas menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun yodium mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853. Konsentrasi 50% memiliki daya hambat

paling besar terutama pada fraksi etil asetat dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana, air dan ekstrak etanol ditunjukkan adanya zona jernih disekitar cakram yang tidak ditumbuhi bakteri. Hal ini disebabkan karena fraksi etil asetat termasuk pelarut semi polar yang dapat melarutkan senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba seperti flavonoid (Oyi *et al.* 2007). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (IndoBIC 2005). Mekanisme kerja flavonoid yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak dapat terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Juliantina *et al.* 2008). Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah dapat menurunkan tegangan permukaan sehingga dapat melisiskan dinding bakteri. Sedangkan mekanisme kerja tanin sebagai antimikroba menurut Naim (2004) berhubungan dengan kemampuan tanin dalam menginaktivasi adhesin sel mikroba (molekul yang menempel pada sel inang).

Fraksi *n*-heksana memiliki aktivitas penghambatan paling kecil dibandingkan fraksi etil asetat, air dan ekstrak etanol yang disebabkan karena pelarut tersebut hanya melarutkan sedikit senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas antimikroba dan juga disebabkan karena ada fraksi *n*-heksana yang belum terpisah, sehingga ada sebagian senyawa metabolit yang tidak terfraksi. Hal inilah yang menyebabkan adanya penghambatan yang tidak terlalu besar pada fraksi *n*-heksana. Sesuai dengan pernyataan bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu ekstrak maka akan semakin besar efek yang ditimbulkannya (Pelczar dan Chan 1998). Namun demikian penggunaan antibiotik Siprofloksasin sebagai kontrol positif masih lebih efektif digunakan di masyarakat dibanding hasil ekstrak maupun fraksi daun yodium (*J. multifida*) terhadap bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853. Hasil difusi dapat dilihat dilampiran 8.

Analisis data pada penelitian secara difusi dianalisis menggunakan (ANOVA) *Two Way* dengan metode ini informasi yang bisa diperoleh dengan membandingkan perbedaan rata-rata antar kelompok yang telah dibagi pada dua variabel independen. Hasil uji *levene's test of equality of error* menunjukkan bahwa nilai signifikansinya sebesar $0,001 < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan varian antar group sama secara signifikan. Hasil data yang kemudian diuji dengan *Two way Anova* untuk nilai-nilai penting yang bisa disimpulkan menunjukkan bahwa signifikansi pada corrected model adalah $0,000 < 0,05$ artinya model valid. Intercept nilai (sig) $< 0,05$ artinya intercept signifikan. Perlakuan nilai (sig) $< 0,05$ artinya tidak berpengaruh signifikan. Konsentrasi nilai (sig) $< 0,05$ artinya tidak berpengaruh signifikan. Perlakuan*Konsentrasi: (sig) $< 0,05$ artinya berpengaruh signifikan. Error artinya nilai error model, semakin kecil maka model semakin baik. R Squared adalah 0,959 dimana mendekati 1, berarti korelasi kuat.

Hasil data uji post hoc test dengan menilai adanya perbedaan signifikan antar kelompok, sedangkan pada tabel tukey post hoc digunakan untuk menilai kategori manakah dari variabel konsentrasi yang memiliki perbedaan signifikan. yang ada perbedaan signifikan menunjukkan tanda (*) pada angka *mean difference*, artinya hasil diameter hambat ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun yodium menunjukkan adanya perbedaan yang tidak terlalu signifikan. Diagram plot berguna untuk menilai apakah ada interaksi efek antar variabel. Namun diagram ini tidak bisa dijadikan bahan acuan yang valid. Tetapi hanya sekedar memberikan gambaran saja. Hasil menunjukkan bahwa pada fraksi etil asetat memiliki diameter hambat paling tinggi pada konsentrasi 50%. Tabel dapat dilihat dilampiran 19.

11. Pengujian antibakteri fraksi teraktif daun yodium secara dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan metode dilusi dari fraksi teraktif etil asetat untuk mengetahui KHM dan KBM, dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%, 0,78125%, 0,390625%; kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-).

Aktivitas antibakteri tidak dapat terlihat karena sampel yang digunakan dalam penelitian ini keruh sehingga mempersulit pengamatan KHM. Sehingga dilanjutkan dengan penggoresan pada media selektif. Metode dilusi bermanfaat untuk mengetahui dosis minimal dari obat yang bersifat antibakteri (Pratiwi 2008). KBM yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan menginokulasi sediaan dari tabung uji pada media selektif yaitu PSA dalam cawan petri. KBM ditentukan pada medium PSA dengan konsentrasi minimum yang tidak menunjukkan pertumbuhan *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Tabel 11. Hasil aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak daun yodium terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853

No	Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat		
		I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	50	-	-	-
3	25	-	-	-
4	12,5	-	-	-
5	6,25	+	+	+
6	3,125	+	+	+
7	1,5625	+	+	+
8	0,78125	+	+	+
9	0,390625	+	+	+
10	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :

(-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : Ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-) : Fraksi etil asetat

Kontrol (+) : Suspensi bakteri

Fraksi etil asetat daun yodium (*J. multifida*) terbukti memiliki daya hambat minimum terhadap aktivitas antibakteri. Hal ini mungkin disebabkan interaksi antara senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan KBM terbaik 12,5%. Hal ini dapat disebabkan karena senyawa-senyawa antibakteri yang terkandung dalam daun yodium (*J. multifida*) bersifat semipolar, sehingga terlarut pada fraksi etil asetat. Fraksi dapat melarutkan flavonoid, sehingga diduga efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Flavonoid memiliki aktivitas antibakteri dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki kembali (Prayudhani *et al.* 2012).

Tabel 12. Hasil uji aktivitas antibakteri Sipprofloksain terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853

No	Konsentrasi (%)	Siprofloksasin		
		I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	0,2	-	-	-
3	0,1	-	-	-
4	0,05	-	-	-
5	0,025	-	-	-
6	0,0125	-	-	-
7	0,00625	-	-	-
8	0,003125	-	-	-
9	0,0015625	-	-	-
10	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :

- (-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri
 (+) : Ada pertumbuhan bakteri
 Kontrol (-) : Sipprofloksasin
 Kontrol (+) : Suspensi bakteri

Hasil tabel diatas terlihat bahwa Sipprofloksasin mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853 dengan konsentrasi KBM yaitu 0,0015625 % sebagai pembanding pada fraksi etil asetat yang mempunyai KBM yaitu 12,5%. Hasil KBM pada antibiotik Sipprofloksasin jauh lebih kecil dari pada fraksi etil asetat yang menunjukkan bahwa semakin rendah nilai KBM dari sebuah antibiotik, maka sensitivitas dari bakteri akan semakin besar. Penggunaan antibiotik Sipprofloksasin masih lebih efektif digunakan di masyarakat dibanding hasil ekstrak maupun fraksi daun yodium (*J. multifida*) terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853. Hasil dilusi Sipprofloksasin dapat dilihat pada lampiran 9.

12. Identifikasi kandungan kimia fraksi secara kualitatif

Hasil fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yang diperoleh ditimbang 100 mg dilarutkan kedalam 20 ml aquadest panas. Filtrat yang diperoleh diidentifikasi kimia kandungan senyawa fraksi daun yodium (*J. multifida*) dapat dilihat pada tabel 13.

Tabel 13. Hasil identifikasi kimia fraksi daun yodium

Senyawa	Pustaka	Interpretasi hasil fraksi		
		<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
Alkaloid	Reaksi positif ditandai dengan terbentuk endapan menggumpal warna putih/ kuning pada reagen Mayer dan endapan merah sampai jingga pada reagen Dragendorf (Alamsyah <i>et al.</i> 2014)	+	+	+
Flavonoid	Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Puspasari <i>et al.</i> 2014)	+	+	+
Saponin	Reaksi positif ditandai dengan terbentuk busa yang stabil + 2 tetes HCl 2N busa tidak hilang (Puspasari <i>et al.</i> 2014)	+	-	+
Tanin	Reaksi positif terbentuk warna coklat kehitaman/ biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Alamsyah <i>et al.</i> 2014)	+	+	+

Keterangan : + : memiliki senyawa
- : tidak memiliki senyawa

Berdasarkan hasil identifikasi tersebut didapatkan bahwa fraksi *n*-heksana dan fraksi air yang memiliki senyawa alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin menunjukkan hasil positif. Sedangkan fraksi etil asetat menunjukkan hasil positif pada senyawa alkaloid, flavonoid dan tanin. Hasil identifikasi fraksi etil asetat berbeda dengan hasil identifikasi pada serbuk maupun ekstrak hal ini dikarenakan kandungan senyawanya berubah. Kemungkinan senyawa yang terdapat dalam serbuk maupun ekstrak masih tercampur satu sama lain.

13. Identifikasi kimia fraksi paling aktif secara KLT

Identifikasi terhadap kandungan kimia dengan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) hanya dilakukan pada fraksi etil asetat karena fraksi ini mempunyai aktivitas antibakteri yang paling aktif terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853. Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui beberapa senyawa antibakteri yang terkandung pada fraksi etil asetat, yaitu alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin.

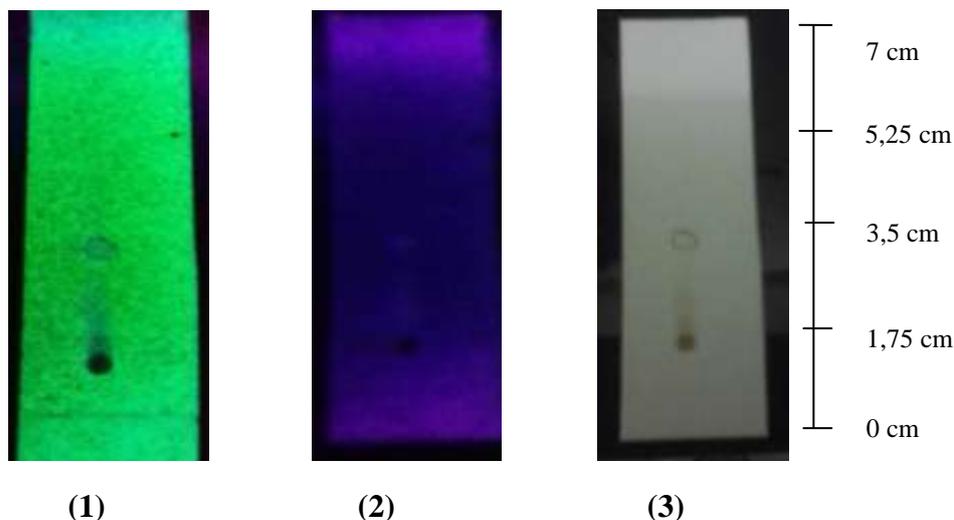
Fase diam yang digunakan plat silica. Penggunaan bahan silica dipilih karena pada umumnya silica digunakan untuk memisahkan senyawa asam-asam amino, fenol, alkaloid, asam lemak, sterol dan terpenoid (Sastrohamidjojo 2007). Fraksi teraktif etil asetat dilarutkan dengan pelarut etil asetat p.a kemudian ditotolkan ke dalam plat dengan menggunakan pipet kapiler pada jarak 1 cm dari

garis bawah dan 0,5 cm dari garis atas. Selanjutnya dilusi dengan menggunakan eluan yang memberikan hasil pemisahan terbaik pada KLT.

13.1 Identifikasi senyawa alkaloid secara KLT. Hasil identifikasi senyawa alkaloid menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak toluene : etil asetat : dietilamin (7 : 2 : 1). Hasil KLT diangin-anginkan dan pengamatan pada sinar UV 254 nm berwarna coklat kehitaman, sedangkan pada sinar UV 366 nm berwarna hijau. Penambahan pereaksi semprot menggunakan Dragendrof menghasilkan warna jingga sampai merah tua. Berdasarkan uji tersebut menunjukkan positif mengandung alkaloid. Hasil perhitungan nilai Rf dapat dilihat pada lampiran 21.

Tabel 14. Hasil identifikasi alkaloid secara KLT

Rf	Hasil warna yang terbentuk		
	UV 254 nm	UV 366 nm	Pereaksi semprot Dragendrof
0,51 cm	Coklat kehitaman	Hijau	Jingga sampai merah tua



Gambar 7. Hasil identifikasi alkaloid

Keterangan :
 1. UV 254 nm
 2. UV 366 nm
 3. Hasil pereaksi semprot Dragendrof

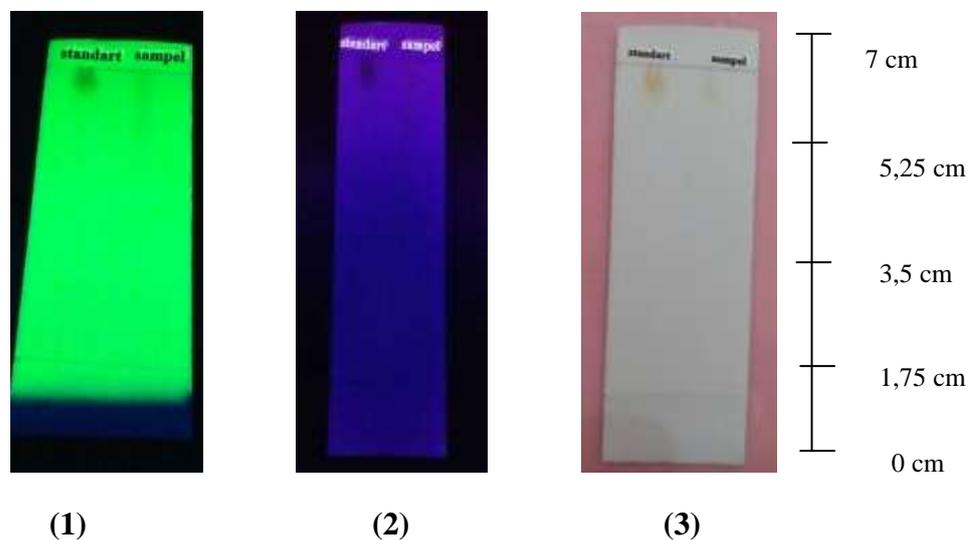
13.2 Identifikasi senyawa flavonoid secara KLT. Hasil identifikasi senyawa flavonoid menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak n-butanol : asam asetat : air (4 : 5: 1). Pemilihan fase gerak BAA karena mampu memberikan pemisahan terbaik, dapat dilihat dari komposisinya yaitu eluen tersebut bersifat

sangat polar sehingga bisa memisahkan senyawa flavonoid yang juga bersifat polar. Eluen yang baik ialah eluen yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya noda. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas (Harborn 1987).

Hasil pengamatan pada sinar UV 254 nm berwarna meredam menunjukkan adanya bercak yang sama antara pembanding dan sampel, sedangkan pada sinar UV 366 nm dengan warna biru gelap. Penambahan pereaksi semprot menggunakan uap amonik atau sitroborat menghasilkan warna yang intensif yaitu warna kuning. Berdasarkan uji tersebut menunjukkan positif mengandung Flavonoid. Hasil perhitungan nilai Rf dapat dilihat pada lampiran 21.

Tabel 15. Hasil identifikasi flavonoid secara KLT

Senyawa	Rf	Hasil warna yang terbentuk		
		UV 254 nm	UV 366 nm	Pereaksi semprot Sitroborat
Quersetin	0,98 cm	Meredam	Biru	Kuning
Sampel	0,98 cm	Meredam	Biru	Kuning



Gambar 8. Hasil identifikasi flavonoid

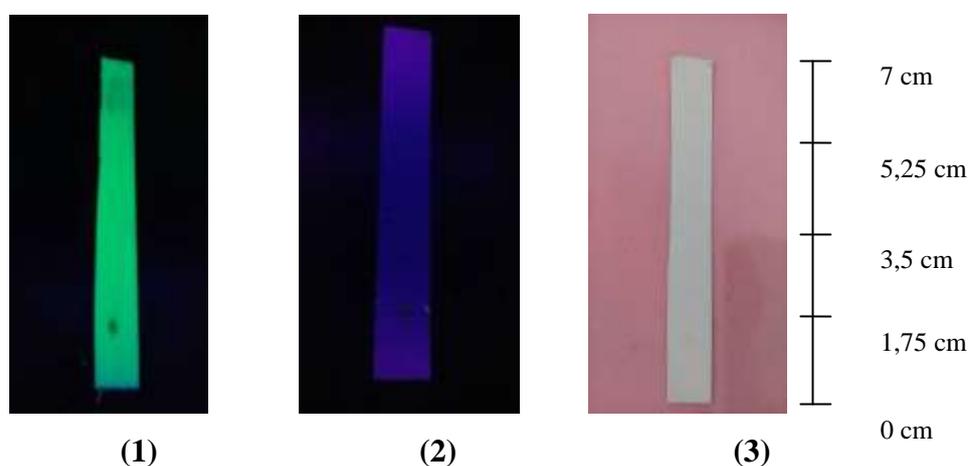
Keterangan :

1. UV 254 nm
2. UV 366 nm
3. Hasil pereaksi semprot Sitroborat

13.3 Identifikasi senyawa saponin secara KLT. Hasil identifikasi senyawa saponin menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : methanol : air (6 : 3 : 1). Hasil pengamatan pada sinar UV 254 nm berwarna kuning, sedangkan pada sinar UV 366 nm berwarna hijau. Penambahan pereaksi semprot menggunakan anisaldehyd dengan hasil berwarna ungu dan dibawah bercak sinar biasa berwarna biru.

Tabel 16. Hasil identifikasi saponin secara KLT

Rf	Hasil warna yang terbentuk		
	UV 254 nm	UV 366 nm	Pereaksi semprot anisaldehyd
0,93 cm	Kuning	Hijau	Ungu dan dibawah bercak sinar biasa berwarna biru



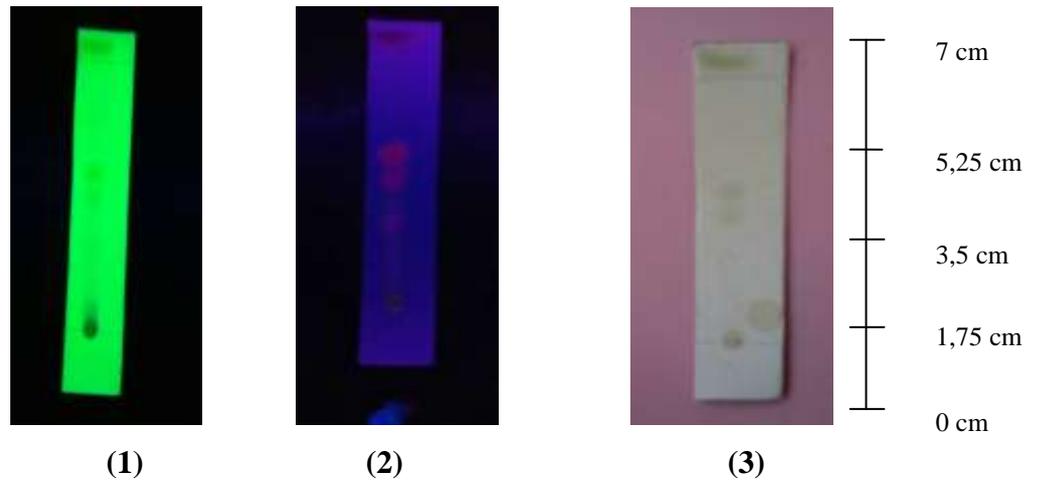
Gambar 9. Hasil identifikasi saponin

Keterangan :
 1. UV 254 nm
 2. UV 366 nm
 3. Hasil pereaksi semprot Anisaldehyd

13.4 Identifikasi senyawa tanin secara KLT. Hasil identifikasi senyawa tanin menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (3 : 7). Hasil pengamatan pada sinar UV 254 nm berwarna gelap dan UV 366 nm berwarna biru hitam. Penambahan pereaksi semprot menggunakan FeCl_3 1% berwarna kuning. Hasil perhitungan nilai Rf dapat dilihat pada lampiran 21.

Tabel 17. Hasil identifikasi tanin secara KLT

Rf	Hasil warna yang terbentuk		
	UV 254 nm	UV 366 nm	Pereaksi semprot FeCl_3 1%
0,48 cm	Gelap	Biru hitam	Kuning



Gambar 10. Hasil identifikasi tanin

- Keterangan :
1. UV 254 nm
 2. UV 366 nm
 3. Hasil pereaksi semprot FeCl₃ 1%

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun yodium (*J. multifida*) terhadap bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun yodium (*J. multifida*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dalam menghambat bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 yang menunjukkan rata-rata diameter hambat pada konsentrasi 50% sebesar 14,7 mm, konsentrasi 25% sebesar 14,4 mm dan pada konsentrasi 12,5% sebesar 11,7 mm.

Ketiga, fraksi etil asetat mempunyai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yaitu pada konsentrasi 12,5%.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan kandungan senyawa-senyawa kimia murni teraktif dengan metode isolasi senyawa.

Kedua, dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri daun yodium (*J. multifida*) terhadap bakteri yang lain dengan metode ekstraksi lain.

Ketiga, perlu dilakukan uji dilusi pada semua ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun yodium (*J. multifida*) terhadap bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Keempat, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut aktivitas antibakteri dengan metode uji secara *in Vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoes.G. 2007. *Teknologi Bahan Alam*, ITB Press Bandung.
- Aiyelaagbe O.O, Oguntuase B.J, Arimah B.D and Adeniyi B.A 2008. *The antimicrobial activity of jatropha multifida extract and chromatographic fractions against sexually transmitted infections. J. Med,Sci.*, 8(2):143-147.
- Alamsyah, Heru Kurniawan *et al.* 2014. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut Sargassum cinereum (J.G.Agardh) dari Perairan Pulau Panjang Jepara terhadap Bakteri Escherichia coli dan Staphylococcus epidermidis*, Semarang: Universitas Diponegoro. Vol 3. No 2.
- Anonim. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Ansel HC. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi. Ed ke-4*. Jakarta: Universitas Indonesia. Hlm 60-65.
- Arianingsih, N.W.E.P. 2015. *Pengaruh Ekstak Daun Yodium (jatropha multifida Linn) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus*.
- Arifani, N.F., 2016, Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi n-Heksana, Etil Asetat, dan Air dari Ekstrak Etanol Kayu Siwak (*Salvadora persica L*) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, [Skripsi], Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.
- Arifianti L, Oktariana RD, Kusumawati I. 2014. Pengaruh jenis pelarut pengestraksi terhadap kadar sinensetin dalam ekstrak daun *Orthosiphon stamineus* benth. *E-Journal Planta Husada* 2;1-4.
- Armanto R. 2009. *Memproduksi Minyak Atsiri Berkualitas*. Jakarta: Penebar Swadaya. Hlm. 32-33.
- Backer C.A. & Brink R.C.B. (1965); *Flora of Java* (Spermatophytes only). N.V.P. Noordhoff-Groningen-The Netherlands.
- Bamford KB, Gillespie SH. 2007. *At a Glance Mikrobiologi Medis dan Infeksi*. Ed ke-3. Jakarta: Erlangga. hlm 56-57.
- Bauman R. 2007. *Microbiology With Diseases by Toxonomy*. Ed ke-2. San Fransisco: Person Educating Inc.
- Bonang G, Koeswardono, E.S., 1982. *Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik*. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran. Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya. Gramedia. Jakarta. hlm 190-191.

- Bridson , E.Y. 1998. *The Oxoid Manual*. Edisi 8. England: Oxoid Limited.
- Brooks, G.F., Janet, S.B., Stephen, A.M., 2001, Jawetz, Melnick, and Adelberg's, Mikrobiologi Kedokteran, Alih bahasa oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E.B., Mertaniasih, N.M., Harsono. S., dan Alimsardjono, L., Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Darmandi. 2008. Infeksi *Nosokomial: Problematika dan Pengendaliannya*. Jakarta: Salemba Medika. Hlm 80-81.
- Darmawi. *et al.* 2013. Daya Hambat Getah Jarak cina (*Jatropha multifida* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Jurnal Medika Veterinaria*: Vol. 7 No. 2.
- [Departemen Kesehatan R.I]. 1977.*Materia Medika Indonesia*, Jilid I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- [Departemen Kesehatan R.I]. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 5-10.
- [Departemen Kesehatan R.I]. 1987. *Analisis Obat Tradisional*. Jilid 1. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Departemen Kesehatan R.I]. 1989. *Materia Medika Indonesia*, Jilid v. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. Hlm 219,247,392, 419, 472.
- [Departemen Kesehatan R.I]. 1991, *Petunjuk Pemeriksaan Mikrobiologi Makanan Dan Minuman*, 20, 33, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- [Departemen Kesehatan RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- [Departemen Kesehatan RI]. 2005. *Materia Medika Indonesia. Jilid III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dianasari N. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L). Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae* Serta Bioautografinya [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [Farmakope Indonesia]. 1979. *Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Edisi III*.
- Ganiswara. 2007. Farmakologi dan Terapi. Ed ke-5. Jakarta: Gaya Baru. Hlm 585-598.

- Goodman, Gilman. 2007. *Manual Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: EGC.
- Green James, Rianto S. 2005. *Pengobatan Alami Mengatasi Bakteri*. Jakarta: Prestasi Pustaka.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah; Bandung: ITB Press. hlm 77-88, 127- 128.
- Harborne, J. B. 1996. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Diterjemahkan oleh : K. Padmawinata dan I. Soediro. Penerbit ITB, Bandung.
- Hargono, D.1986. *Sediaan Galenik dan Uji Klinik Obat Tradisional*. Jakarta: Penerbit Direktorat Jendral POM.
- Hariana A. 2004. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya.*, Seri I, Penebar Swadaya, Jawa Barat 138-139.
- Hariana A. 2013. *262 Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Jakarta: Penebar Swadaya. Hal 134.
- Harminta, R.M. 2004. *Analisa Hayati*. Jakarta: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Hasibuan, S.A. 2016. *Pebandingan Daya Hambat Ekstrak Daun Jarak Pagar (Jatropha curcas Linn) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus Dan Escherichia coli Secara In Vitro.*[Skripsi]. Lampung: Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung.
- Ilmi, A. N. 2009. *Tanaman Yodium Jatropha multifida Sebagai Bahan Fortifikasi Bath (Abstrak)*. Karya Tulis Ilmiah Strata Satu. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Surabaya.
- Indonesian Biotechnology Information Centre (IndoBIC), 2005. *Senyawa Antimikroba Dari Tanaman*.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2007. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Bonang G, penerjemah: Jakarta: EGC. Terjemahan dari *Medical Microbiologi*. Hlm 58-63, 291-292,303-306.
- Jawetz, E., Melnick., J.L., E.A., 2005. *Medical Microbiology*, 23 Th Ed. Elferia Nr, Penerjemah : Jakarta, hlm 170, 229
- Juliantina F., Dewa A.C.M., Bunga N., Titis N., Endrawati T.B., 2008. *Manfaat Sirih Merah (piper crocatum) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif*. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*.

- Katrin D., Nora I., Berlian S., 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Malek (*Lisea graciae* Vidal) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Echerichia coli*. JKK, Volume 4(1), halaman 7-12.
- Kementerian Kesehatan RI]. 2013. *Suplemen III Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi I. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 106-107.
- Khoirani N. 2013. *Karakterisasi Simplisia dan Standarisasi Ekstrak Etanol Herba Kemangi (*Ocimum amoericanum*)* [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Koensoemardiyah, 2000, Kontrol Kualitas Simplisia dan Pengolahan Pasca Panen, dalam Risalah Seminar Upaya Peningkatan Kesehatan dan Ekonomi melalui Budidaya Tumbuhan Obat serta Pencegahan Penyalahgunaan Narkotik dan Bahan Berbahaya, Puslitbang Tumbuhan Obat Indonesia, Yogyakarta, 77-81.
- Markham KR. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Penerjemah; Kosasih Padmawinata. Bandung: Institut Teknologi Bandung. Terjemahan dari: *Techniques of Flavonoid Identification*.
- Marliana, S.D., Suryanti, V., & Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*, 3(1): 26-31.
- Marliana E. 2007. Analisis senyawa metabolit sekunder dari batang *Spatholobus ferrugineus* (Zoll & Moritzi) Bent yang berfungsi sebagai antioksidan [jurnal]. Samarinda: Universitas Mulawarman.
- Maryati, C. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Jarak Tintir (*Jatropha multifida* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara InVitro.
- Mayasari, E. 2006. *Pseudomonas aeruginosa; Karakteristik Infeksi dan Penanganan*. [Http://library.usu.ac.id](http://library.usu.ac.id) [24 Desember 2014].
- Meirastuti, *et al.* 2013. [jurnal]. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi *n*-heksana, Eter dan Air dari Ekstrak Etanolik Daun Jambu Mede (*Anacardium occidentale* L.) terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 dengan Metode Difusi.
- Mudihardi *et al.* 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*, Surabaya: Salemba Medika. Hlm 318-320.
- Muhaimin, *et al.* 2003. Optimasi Proses Overproduksi, Pemurnian dan Karakterisasi Protein Mga Sebagai Molekul Target Untuk Pencegahan

- Infeksi Oleh *Streptococcus Pyogenes*. *Jurnal Matematika dan Sains*. Vol. 8, No 3. Hal. 117-123.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan* 7:361-367.
- Mulyadi M, *et al.* 2013. *Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-alang (Imperata cylindrica) Dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram*. Vol 1, No 1, Hal 35 – 42.
- Mulyani S. 2006. *Anatomi Tumbuhan*. Yogyakarta: Kanisius. Hal 72-73.
- Naim, R. 2004. *Senyawa Antimikroba Dari Tumbuhan*. Fkh dan Sekolah Pascasarjana Ipb. Diakses Tanggal 22 April 2009.
- Oyi, A.R., J.A. Onaolapo, A.K. Haruna dan C.O. Morah. 2007. Antimicrobial screening and stability studies of the crude extract of *Jatropha curcas* Linn. Latex (Euphorbiaceae). *Nig J pharm Sci* 6(2): 14-20.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 1988. *Dasa-dasar Mikrobiologi*. Jilid 2. Hadioetomo RS, Imas T, Angka SL, penerjemah; Jakarta: UI-Press. Terjemahan dari : *Elemens of Microbiology*.
- Power DA, Mc Cuen PJ. 1988. *Mannual BBI. Product and Laboratory Prosedurer Sixth Edition*. Maryland: Becton Dickinson.
- Prayudhani *et al.* 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Sawo Kecil (*Manilkara kauki L Dubard*) Terhadap Bakteri *Escherichia Coli*. *Jurnal SMK Negeri 1 pasuruan dan jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang*.
- Pratiwi, S.T., 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga. Hal 17-18
- Purba, Priska Noviana. 2013. Uji sensitivitas Antibiotik Siprofloksasin, Amikasin, Sefepim, dan Piperasilin Tazobaktam terhadap *Pseudomonas sp.* Hasil Isolasi dari Urin Pasien Infeksi Saluran Kemih di Rs PKU Muhammadiyah Surakarta Bulan Maret-April Tahun 2013 [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
- Puspasari R.K.FM, *et al.* 2014. *Studi Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Daun Sukun (Artocarpus Altilis) Terhadap pertumbuhan Bakteri Pseudomonas aeruginosa*. Jurnal: Sains dan Teknologi Kimia, Jilid 5 No. 2.
- Rahmawati. 2010. *Karakterisasi Simplisia dan Uji aktivitas antibakteri dari Ekstrak Kulit Buah Tanaman Jengkol (Pithecellebiium lobatum Bent)*.
- Reapinam E., 2007, Kajian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kulit Kayu Mesoyi (*Cryptocaria massoia*) Terhadap Bakteri Patogen dan Pembusuk

- Makanan. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor. (Skripsi).
- Robinson, T., 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi VI. Bandung: ITB. hlm 57-59, 156-157, 281-284.
- Saifudin, Z., 2015. Efektifitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Pepaya (*Carica Papaya L*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. Motorik: Vol 10. Nomor 20.
- Sangi, M.S., Momuat, L.I., & Kumaunang, M. 2012. Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Tepung Gabah Pelepah Aren (*Arenga pinnata*). *Jurnal Ilmiah Sains*, 12(2): 127-134.
- Sari FP, Shofi MS 2011. *Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba Dari Tanaman Yodium (Jatropha multifida Linn) Sebagai Bahan Baku Alternatif Antibiotik Alami*. Laporan Penelitian. Fakultas Kimia dan Teknik Universitas Diponegoro.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Dasar-Dasar Spektroskopi*, edisi kedua, cetakan kedua. Penerbit Liberty: Jogjakarta.
- Sufardin. 2016. *Jumlah Bakteri Salmonella sp Pada Kolom Air dan Sedimen Dibagian Barat Pulau Barranglombo*.
- Suriawiria, U., 1985. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Bandung: Penerbit Angkasa. hlm 60-63.
- Susilowati N. 2010. Aktivitas antioksidan fraksi fraksi ekstrak metanolik daun seligi (*Phyllanthus buxifolius*. Muell, arg) terhadap radikal bebas DPPH [skripsi]. Surakarta : Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
- Syarfati, Eriani, K, et al. 2011. *The Potensial of Jarak Cina (Jatropha multifida L.) Secretion in Healing New-wounded Mice*. Jurusan Biologi. FMIPA Universitas Syiah Kuala Darussalam - Banda Aceh. *Jurnal Natural*. Vol. 11, No. 1, 2011. Diakses pada 23 September 2013.
- Syarif et al. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Tiwari P., Bimleshk., Mandeep K., Gurpreetk., Harleen K. 2011. *Skrining Fitokimia dan ekstraksi*. *International Pharmaceutica Scientia Jan-Maret* 2011: Vol 1 Halaman 113-116.
- Tjay TH dan Rahardja K. 2002. *Obat-obat Penting*. Edisi I. Jakarta: Depkes. Hlm 195-203.
- Wahjono, H. 2007. *Peran Mikrobiologi Klinik Pada Penanganan Penyakit Infeksi*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.

- Waluyo L.2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press. Hlm 41-47.
- Windarwati S.2011. *Pemanfaatan Fraksi Aktif Ekstrak Tanaman Jarak Pagar (Jatropha curcas Linn) Sebagai Zat Antimikroba dan Antioksidan Dalam Sediaan Kosmetik*. Bogor: IPB
- Windono T, Soediatmoko S, Uut T, Eny E, Aniri S, Tenny IE. 2001. Uji peredaman radikal bebas terhadap 1,1-difenil-2-pikrilhidrazyl dari ekstrak kulit buah dan biji anggur (*Vitis vinera L.*) Probolinggo biru dan Bali. *Artocarpus* 1:35- 39.

L

A

M

P

I

R

A

N

Lampiran 1. Determinasi tanaman daun yodium (*J. multifida*)



No : 104/DET/UPT-LAB/10/XI/2016
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Siti Nur Hikmah
NIM : 19133788 A
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Iodium (*Jatropha multifida* L.)**

Determinasi berdasarkan Backer : Flora of Java

1b – 2b – 3b – 4b – 12b – 13b – 14b – 17b – 18b – 19b – 20b – 21b – 22b – 23b – 24b – 25b – 26b – 27a – 28a. familia 99. Euphorbiaceae. 1b – 3b – 4b – 6b – 57b – 73a – 74b – 75b – 77a – 78b – 79a. 45. *Jatropha*. 1b – 3b – 4b. ***Jatropha multifida* L.**

Deskripsi :

- Habitus : Semak, tahunan, tinggi 2 meter.
- Batang : Berkayu, pangkal membesar, bergetah, penampang bulat, bekas daun tampak jelas, masih muda hijau, setelah tua berwarna putih kehijauan.
- Daun : tunggal. Tersebar, panjang 15-20 cm, bulat, bercangap, pertulangan menjari, ujung runcing, pangkal membulat, tepi rata, hijau.**
- Bunga : Majemuk bentuk malai, bertangkai, di ujung cabang, benangsari 8, kepala sari bentuk tapal kuda, putik 3, pendek, kelopak bercangap, merah.
- Buah : Kendaga, panjang ± 1,5 cm, masih muda hijau, setelah tua coklat.
- Akar : Tunggang, putihkekuningan
- Pustaka : Backer C.A. & Brink R.C.B. (1965): *Flora of Java* (Spermatophytes only).
N.V.P. Noordhoff – Groningen – The Netherlands.

Surakarta, 10 November 2016

Pim determinasi



Dra. Kartinah Wirjosoendjojo, SU.

Lampiran 2. Foto tanaman yodium (*J. multifida*) dan serbuk daun yodium

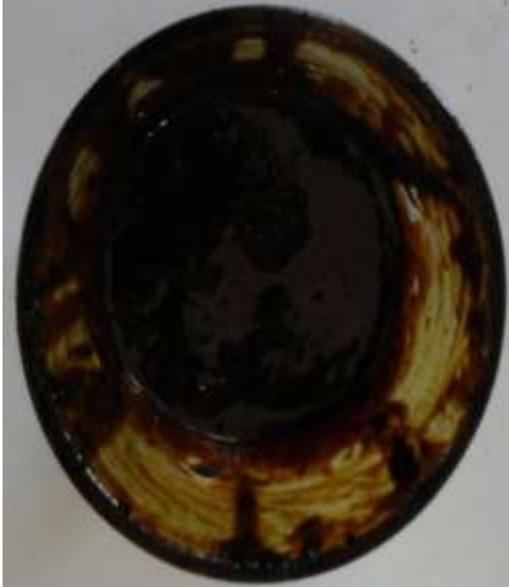


Tanaman yodium (*J. multifida*)



Serbuk daun yodium

Lampiran 3. Foto ekstrak daun yodium, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air



Ekstrak daun yodium



Fraksi *n*-heksana



Fraksi etil asetat



Fraksi air

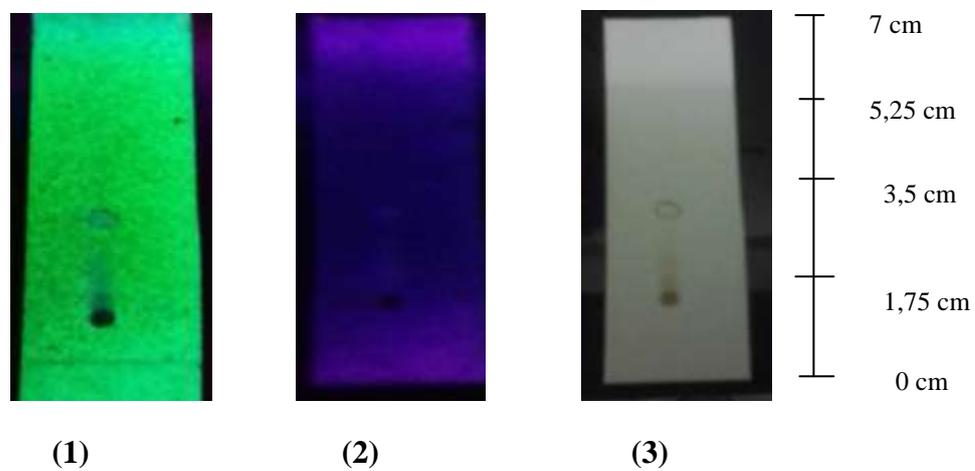
Lampiran 4. Foto identifikasi kimia serbuk dan ekstrak daun yodium

Bahan uji	Senyawa			
	Alkaloid	Flavonoid	Saponin	Tanin
Serbuk				
Ekstrak				

Lampiran 5. Foto identifikasi fraksi daun yodium secara kualitatif

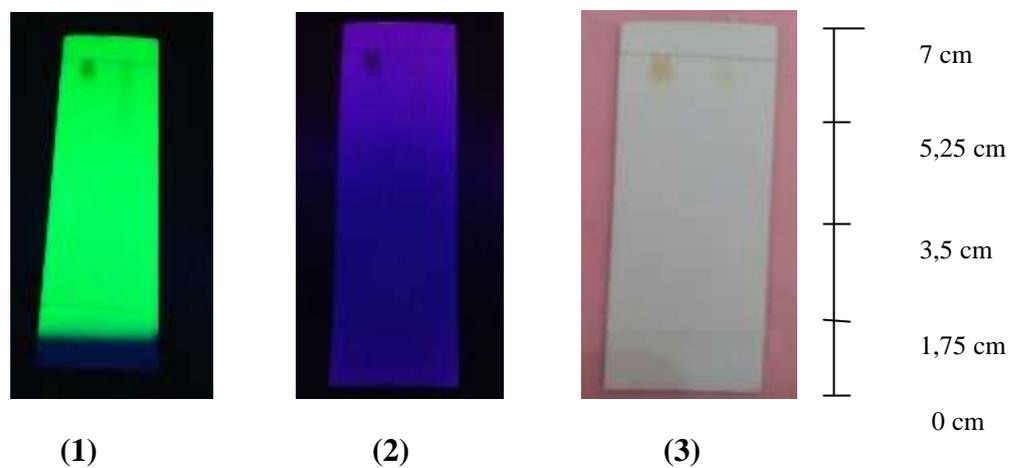
Bahan uji fraksi	Senyawa			
	Alkaloid	Flavonoid	Saponin	Tanin
<i>n</i> -heksana				
Etil asetat				
Air				

Lampiran 6. Foto identifikasi kimia fraksi paling aktif secara KLT



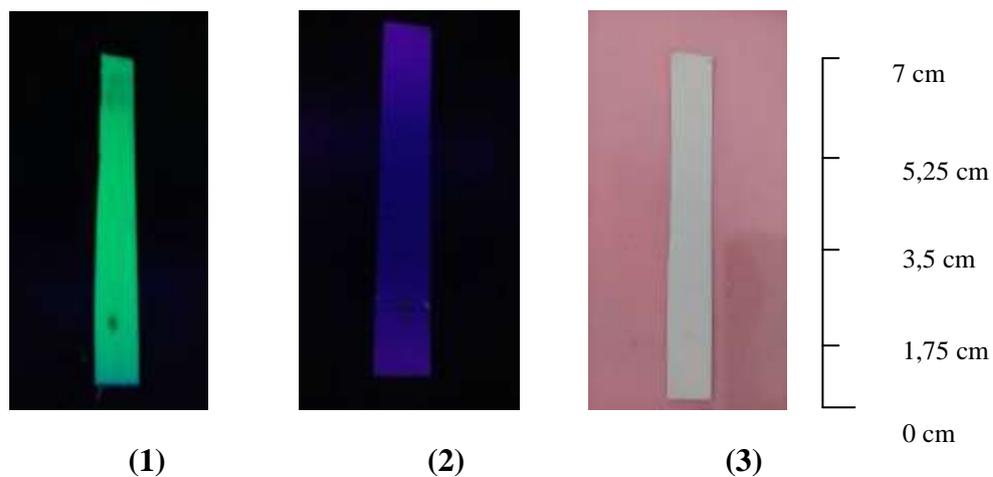
Hasil identifikasi alkaloid

Keterangan : 1. UV 254 nm
2. UV 366 nm
3. Hasil pereaksi semprot Dragendroff



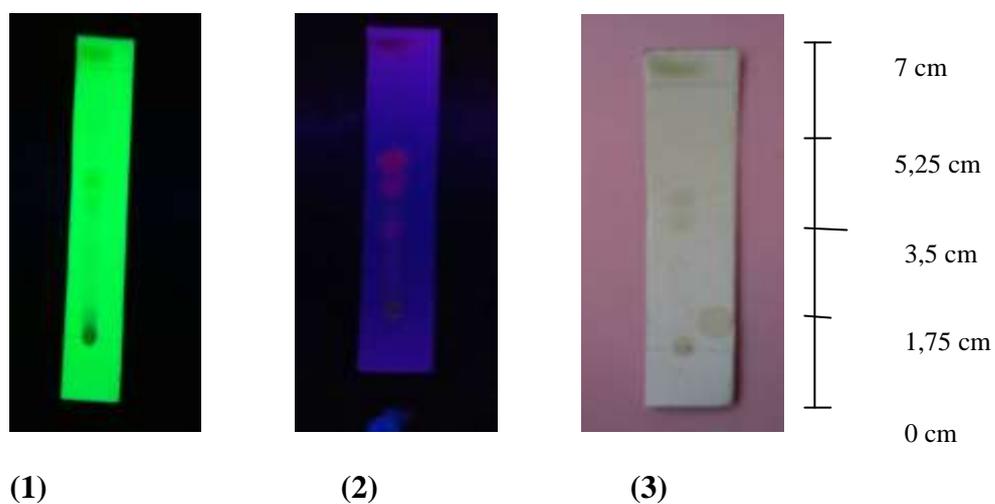
Hasil identifikasi flavonoid

Keterangan : 1. UV 254 nm
2. UV 366 nm
3. Hasil pereaksi semprot Sitroborat



Hasil identifikasi saponin

Keterangan : 1. UV 254 nm
2. UV 366 nm
3. Hasil pereaksi semprot Anisaldehyd



Hasil identifikasi tanin

Keterangan : 1. UV 254 nm
2. UV 366 nm
3. Hasil pereaksi semprot FeCl_3 1%

Lampiran 7. Foto identifikasi bakteri secara goresan, pengecatan Gram, biokimia dan suspensi bakteri uji



Uji goresan



Pengecatan Gram



Uji biokimia

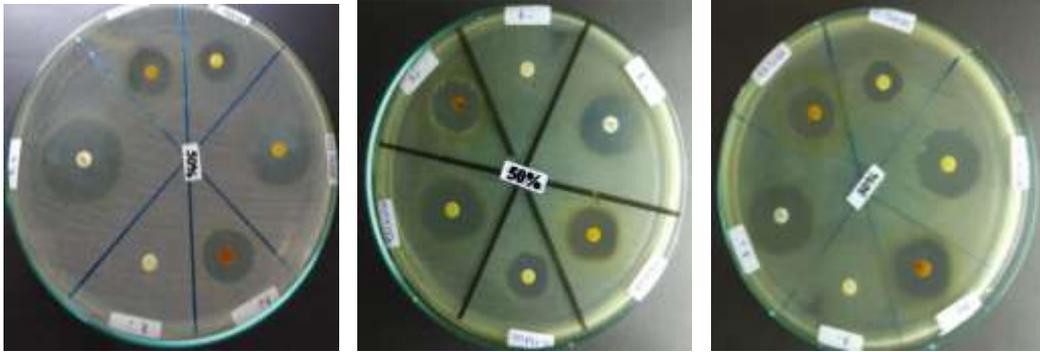


Suspensi bakteri

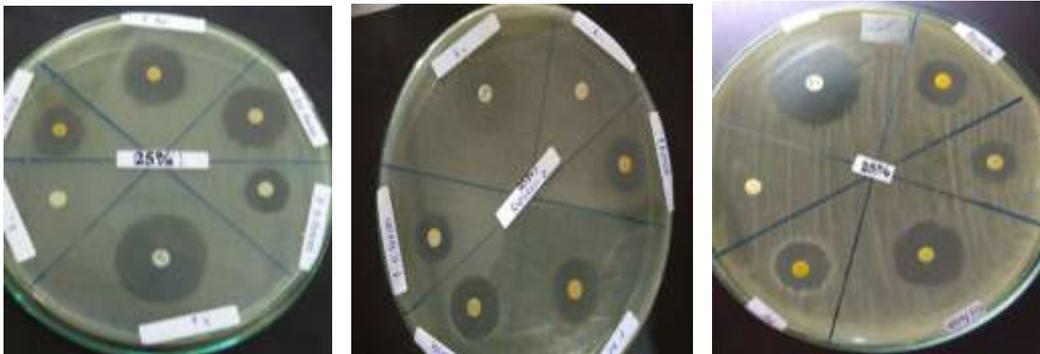
Lampiran 8. Foto pengenceran ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air



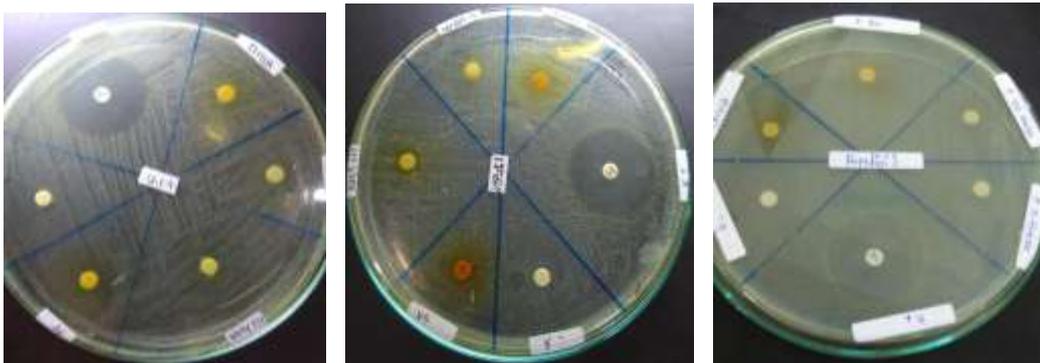
Lampiran 9. Foto hasil uji difusi fraksi *n*-heksana, etil asetat, air terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853



Konsentrasi 50%

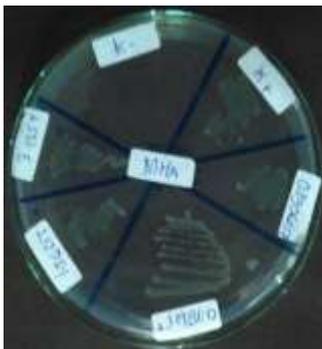


Konsentrasi 25%



Konsentrasi 12,5%

Lampiran 10. Foto hasil uji dilusi fraksi teraktif terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853



Media MHA

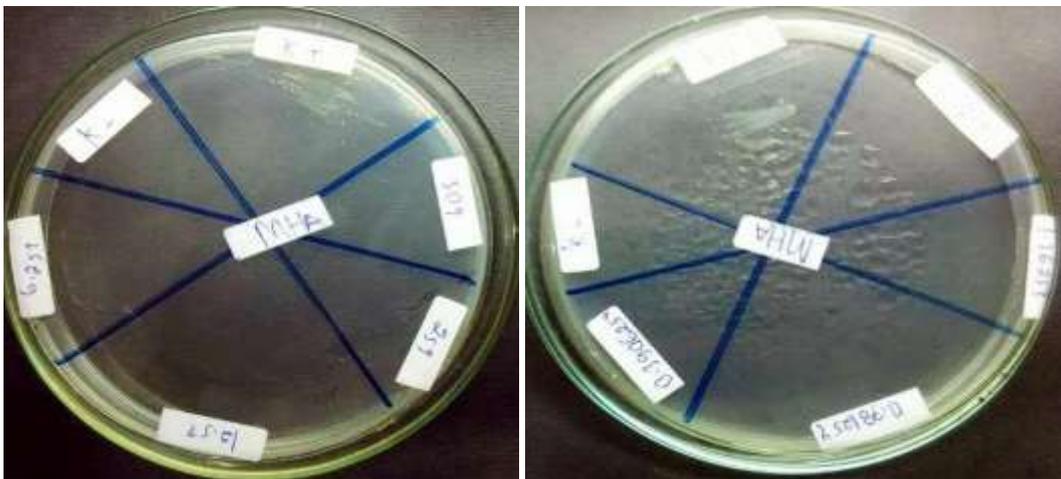


Media PSA

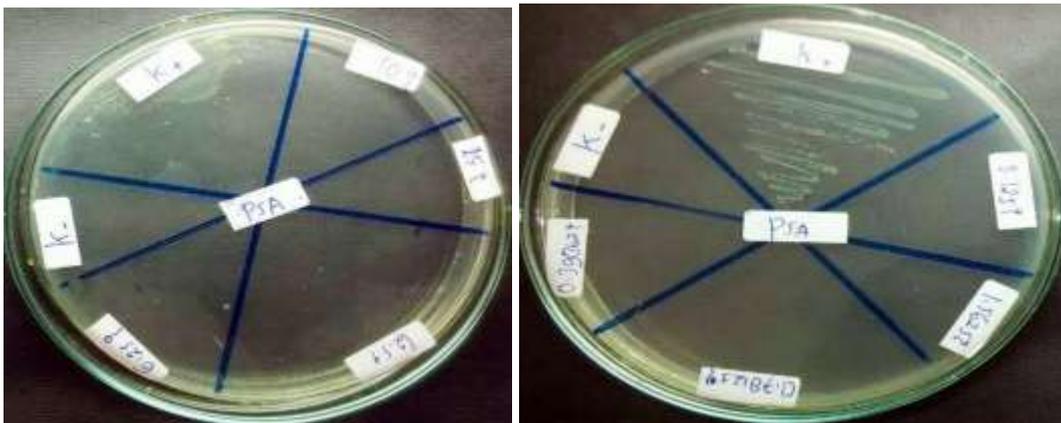


Hasil inokulasi dari fraksi teraktif etil asetat pada media PSA

(Pseudomonas Selektif Agar)



Media MHA



Hasil inokulasi dari Siprofloksasin pada media PSA

(*Pseudomonas* Selektif Agar)

Lampiran 11. Foto alat *moisture balance*, botol maserasi, corong Buchner, evaporator dan corong pisah



Moisture balance



Botol maserasi



Corong Buchner



Evaporator



Corong pisah

Lampiran 12. Foto alat pengayak, timbangan, oven, inkubator, autoklaf



Pengayak



Timbangan



Oven



Inkubator



Autoklaf

Lampiran 13. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun yodium

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (%)
5000	1700	34

$$\begin{aligned}\text{Rendemen serbuk} &= \frac{\text{bobot kering (g)}}{\text{bobot basah (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{1700 \text{ (g)}}{5000 \text{ (g)}} \times 100\% \\ &= 34 \%\end{aligned}$$

Lampiran 14. Perhitungan penetapan kadar lembab menggunakan alat *moisture balance*

No	Bobot serbuk (gram)	Kadar lembab (%)
1.	2,00	4,5
2.	2,00	4,0
3.	2,00	4,5
Rata – rata		4,33

Perhitungan penetapan kadar lembab serbuk daun yodium :

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata} &= \frac{4,5\% + 4,0\% + 4,5\%}{3} \\ &= 4,33 \% \end{aligned}$$

Lampiran 15. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air.

Persentase bobot ekstrak daun yodium

Berat serbuk (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
1500	700	46,67

$$\begin{aligned} \text{Rendemen ekstrak \%} &= \frac{\text{bobot ekstrak kental (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{700 \text{ (g)}}{1500 \text{ (g)}} \times 100\% \\ &= 46,67 \% \end{aligned}$$

Rendemen fraksi *n*-heksana daun yodium

Berat ekstrak (gram)	Fraksi (gram)	Rendemen (%)
120	1,85	1,54

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Fraksi } n\text{-heksana \%} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{1,85 \text{ (g)}}{120 \text{ (g)}} \times 100\% \\ &= 1,54 \% \end{aligned}$$

Rendemen fraksi etil asetat daun yodium

Berat ekstrak (gram)	Fraksi (gram)	Rendemen (%)
120	6,32	5,26

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Fraksi etil asetat \%} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{6,32 \text{ (g)}}{120 \text{ (g)}} \times 100\% \\ &= 5,26 \% \end{aligned}$$

Rendemen fraksi air daun yodium

Berat ekstrak (gram)	Fraksi (gram)	Rendemen (%)
120	23,36	19,46

$$\begin{aligned}\text{Rendemen Fraksi air \%} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{23,36 \text{ (g)}}{120 \text{ (g)}} \times 100\% \\ &= 19,46 \%\end{aligned}$$

Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media

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

Brain infusion	12,5	gram
Heart infusion	5,0	gram
Proteose peptone	10,0	gram
Glucose	1,0	gram
Sodium chloride	5,0	gram
di-sodium hydrogen phosphate	2,5	gram
Aquadest	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 (Bridson 1998).

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

Pepton from Casein	10,0	gram
Pepton from Meat	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 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

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

Pepton from casein	20	gram
Pepton from meat	6	gram
Ammonium Iron (II) citrate	0,2	gram
Sodium thiosulfate	0,2	gram
Aquadest	ad 1000	ml

Bahan-bahan diatas dilarutkan kedalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Bridson 1998).

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

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

Bahan-bahan diatas dilarutkan kedalam Aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

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

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

Bahan-bahan di atas dilarutkan kedalam Aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

f. Formulasi dan pembuatan Citrat Agar

Ammonium hydrogen fosfat	1	gram
DI-potassium hydrogen fosfat	1	gram
Sodium chlorid	5	gram
Magnesium sulfat	0,2	gram
Bromo thymol blue	0,08	gram
Agar-agar	12,5	gram
Aquadest	ad 1000	ml

Bahan-bahan di atas dilarutkan kedalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

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

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

Reagen – reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri (Anonim 2008).

Lampiran 17. Perhitungan pengenceran DMSO (*Dimethyl Sulfoxida*)

Pembuatan DMSO konsentrasi 5 %

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 \times 100\% = 100 \text{ ml} \times 5 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ ml} \times 5\%}{100\%}$$

$$= \frac{500 \text{ ml}}{100}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

Dipipet 5 ml dari larutan awal (100%) kemudian ditambah aquadest steril sampai

100 ml.

Lampiran 18. Pembuatan sediaan untuk uji difusi dan dilusi

A. Ekstrak daun yodium (*J. multifida*)

$$1. 50\% \text{ } ^b/v = 2 \text{ g} / 4 \text{ ml}$$

Ditimbang 2 gram ekstrak daun yodium kemudian dimasukkan dalam vial dan di encerkan dengan DMSO 5% sebanyak 4 ml.

$$2. 25\% \text{ } ^b/v$$

$$\begin{aligned} \text{Rumus} & : V_1 \times C_1 & = & V_2 \times C_2 \\ & V_1 \times 50 & = & 1 \times 25 \\ & V_1 & = & 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Memipet 0,5 ml larutan stok konsentrasi 50% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 1 ml.

$$3. 12,5\% \text{ } ^b/v$$

$$\begin{aligned} \text{Rumus} & : V_1 \times C_1 & = & V_2 \times C_2 \\ & V_1 \times 25 & = & 1 \times 12,5 \\ & V_1 & = & 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Memipet 0,5 ml larutan stok konsentrasi 25% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 1 ml.

B. Fraksi *n*-Heksana daun yodium

$$1. 50\% \text{ } ^b/v = 2 \text{ g} / 4 \text{ ml}$$

Ditimbang 2 gram fraksi *n*-Heksana daun yodium kemudian dimasukkan dalam vial dan di encerkan dengan DMSO 5% sebanyak 4 ml.

$$2. 25\% \text{ } ^b/v$$

$$\begin{aligned} \text{Rumus} & : V_1 \times C_1 & = & V_2 \times C_2 \\ & V_1 \times 50 & = & 1 \times 25 \\ & V_1 & = & 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Memipet 0,5 ml larutan stok konsentrasi 50% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 1 ml.

$$3. 12,5\% \text{ } ^b/v$$

$$\begin{aligned} \text{Rumus} & : V_1 \times C_1 & = & V_2 \times C_2 \\ & V_1 \times 25 & = & 1 \times 12,5 \\ & V_1 & = & 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Memipet 0,5 ml larutan stok konsentrasi 25% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 1 ml.

C. Fraksi etil asetat daun yodium

$$1. 50\% \text{ } ^b/v = 2 \text{ g} / 4 \text{ ml}$$

Ditimbang 2 gram fraksi etil asetat daun yodium kemudian dimasukkan dalam vial dan di encerkan dengan DMSO 5% sebanyak 4 ml.

$$2. 25\% \text{ } ^b/v$$

$$\begin{aligned} \text{Rumus} & : V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & V_1 \times (50\%) = 1 \times (25\%) \\ & V_1 = 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Memipet 0,5 ml larutan stok konsentrasi 50% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 1 ml.

$$3. 12,5\% \text{ } ^b/v$$

$$\begin{aligned} \text{Rumus} & : V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & V_1 \times (25\%) = 2 \times (12,5\%) \\ & V_1 = 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Memipet 0,5 ml larutan stok konsentrasi 25% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 1 ml.

D. Fraksi air daun yodium

$$1. 50\% \text{ } ^b/v = 2 \text{ g} / 4 \text{ ml}$$

Ditimbang 2 gram fraksi air daun yodium kemudian dimasukkan dalam vial dan di encerkan dengan DMSO 5% sebanyak 4 ml.

$$2. 25\% \text{ } ^b/v$$

$$\begin{aligned} \text{Rumus} & : V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & V_1 \times (50\%) = 1 \times (25\%) \\ & V_1 = 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Memipet 0,5 ml larutan stok konsentrasi 50% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 1 ml.

3. 12,5% ^{b/v}

$$\begin{aligned} \text{Rumus} & : V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & V_1 \times (25\%) = 1 \times (12,5\%) \\ & V_1 = 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Memipet 0,5 ml larutan stok konsentrasi 25% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 1 ml.

E. Pembuatan larutan stok dilusi

Larutan stok 50% = % ^{b/v} = 50 gram/100 ml

Konsentrasi 50% = 0,5 gram/ml

$$\begin{aligned} \text{Konsetrasi } 25\% & = V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & 0,5 \times (50\%) = V_2 \times C_2 \\ & C_2 = 25\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsetrasi } 12,5\% & = V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & 0,5 \times (25\%) = V_2 \times C_2 \\ & C_2 = 12,5\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsetrasi } 6,25\% & = V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & 0,5 \times (12,5\%) = V_2 \times C_2 \\ & C_2 = 6,25\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsetrasi } 3,125\% & = V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & 0,5 \times (6,25\%) = V_2 \times C_2 \\ & C_2 = 3,125\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsetrasi } 1,56\% & = V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & 0,5 \times (3,125\%) = V_2 \times C_2 \\ & C_2 = 1,56\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsetrasi } 0,78\% & = V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & 0,5 \times (1,56\%) = V_2 \times C_2 \end{aligned}$$

$$C_2 = 0,78\%$$

$$\text{Konsetrasi } 0,39\% = V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$0,5 \times (0,78\%) = V_2 \times C_2$$

$$C_2 = 0,39\%$$

Kontrol negatif (-) : berisi 1 ml fraksi teraktif

Kontrol positif (+) : berisi 1 ml suspensi bakteri

Lampiran 19. Perhitungan pengujian dosis antibiotik Siprofloksasin

Dosis siprofloksasin : 200 mg/ 100 ml

: 0,2 g/100 ml = 0,2 % b/v

200 mg dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril

Konsentrasi 0,1%

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$0,5 \times (0,2\%) = V_2 \times C_2$$

$$C_2 = \frac{0,5 \text{ ml} \times 0,2\%}{1 \text{ ml}}$$

$$C_2 = 0,1 \%$$

Konsentrasi 0,05%

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$0,5 \text{ ml} \times (0,1\%) = V_2 \times C_2$$

$$C_2 = \frac{0,5 \text{ ml} \times 0,1\%}{1 \text{ ml}}$$

$$C_2 = 0,05 \%$$

Konsentrasi 0,025%

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$0,5 \text{ ml} \times (0,05\%) = V_2 \times C_2$$

$$C_2 = \frac{0,5 \text{ ml} \times 0,05\%}{1 \text{ ml}}$$

$$C_2 = 0,025 \%$$

Konsentrasi 0,0125%

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 0,5 \text{ ml} \times (0,025\%) &= V_2 \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{0,5 \text{ ml} \times 0,025\%}{1 \text{ ml}} \\
 C_2 &= 0,0125 \%
 \end{aligned}$$

Konsentrasi 0,00625%

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 0,5 \text{ ml} \times (0,0125\%) &= V_2 \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{0,5 \text{ ml} \times 0,0125\%}{1 \text{ ml}} \\
 C_2 &= 0,00625 \%
 \end{aligned}$$

Konsentrasi 0,00312%

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 0,5 \text{ ml} \times (0,00625 \%) &= V_2 \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{0,5 \text{ ml} \times 0,00625\%}{1 \text{ ml}} \\
 C_2 &= 0,00312 \%
 \end{aligned}$$

Konsentrasi 0,00156%

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 0,5 \text{ ml} \times (0,00312\%) &= V_2 \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{0,5 \text{ ml} \times 0,00312\%}{1 \text{ ml}} \\
 C_2 &= 0,00156 \%
 \end{aligned}$$

Kontrol negatif (-) : berisi 1 ml antibiotik siprofloksasin

Kontrol positif (+) : berisi 1 ml suspensi bakteri

Lampiran 20. Standart kekeruhan Mc Farland

Standart	Volume dalam ml		Number of Bacteria / mL/(10 ⁸) Represented
	1% BaCL ₂	1% H ₂ SO ₄	
0,5	0,5	99,5	1,5
1	1,0	99,0	3
2	2,0	98,0	6
3	3,0	97,0	9
4	4,0	96,0	12
5	5,0	95,0	15
6	6,0	94,0	18
7	7,0	93,0	21
8	8,0	92,0	24
9	9,0	91,0	27
10	10,0	90,0	30

Lampiran 21. Hasil KLT fraksi etil asetat

- **Identifikasi KLT alkaloid**

Fase diam : Silica gel GF₂₅₄

Fase gerak : Toluene : Etil asetat : Dietilamin (7 : 2 : 1)

Pereaksi semprot : Dragendrof

$$\begin{aligned} \text{Rf fraksi etil asetat} &= \frac{\text{Jarak bercak dari titik awal}}{\text{jarak yang ditemuh oleh fase gerak}} \\ &= \frac{2,5 \text{ cm}}{4,9 \text{ cm}} \\ &= 0,51 \text{ cm} \end{aligned}$$

- **Identifikasi KLT flavonoid**

Fase diam : Silica gel GF₂₅₄

Fase gerak : Butanol : Asam asetat : Air (4 : 1: 5)

Pereaksi semprot : Sitroborat

$$\begin{aligned} \text{Rf fraksi etil asetat} &= \frac{\text{Jarak bercak dari titik awal}}{\text{jarak yang ditemuh oleh fase gerak}} \\ &= \frac{5,9 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} \\ &= 0,98 \text{ cm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf pembanding} &= \frac{\text{Jarak bercak dari titik awal}}{\text{jarak yang ditemuh oleh fase gerak}} \\ &= \frac{5,9 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} \\ &= 0,98 \text{ cm} \end{aligned}$$

- **Identifikasi KLT saponin**

Fase diam : Silica gel GF₂₅₄

Fase gerak : Kloroform : Metanol : Air (6 : 3 : 1)

Pereaksi semprot : Anisaldehyd

$$\begin{aligned} \text{Rf fraksi etil asetat} &= \frac{\text{Jarak bercak dari titik awal}}{\text{jarak yang ditemuh oleh fase gerak}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &= \frac{5,6 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} \\ &= 0,93 \text{ cm} \end{aligned}$$

- **Identifikasi KLT tanin**

Fase diam : Silica gel GF₂₅₄

Fase gerak : *n*-heksana : Etil asetat (3 : 7)

Pereaksi semprot : FeCl₃ 1%

$$\begin{aligned} \text{Rf fraksi etil asetat} &= \frac{\text{Jarak bercak dari titik awal}}{\text{jarak yang ditemuh oleh fase gerak}} \\ &= \frac{2,4 \text{ cm}}{4,9 \text{ cm}} \\ &= 0,48 \text{ cm} \end{aligned}$$

Lampiran 22. Analisis Data Hasil Difusi

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
perlakuan	1	ekstrak	9
	2	fraksi n-heksana	9
	3	fraksi etil asetat	9
	4	fraksi air	9
konsentrasi	1.0	12,5%	12
	2.0	25%	12
	3.0	50%	12

Descriptive Statistics

Dependent Variable:diameterhambat

perlakuan	konsentrasi	Mean	Std. Deviation	N
ekstrak	12,5%	8.9000	.17321	3
	25%	11.7333	.23094	3
	50%	11.8333	.28868	3
	Total	10.8222	1.45669	9
fraksi n-heksana	12,5%	8.2333	.40415	3
	25%	9.5667	.23094	3
	50%	10.4333	.23094	3
	Total	9.4111	.99429	9
fraksi etil asetat	12,5%	11.7667	.40415	3
	25%	14.4333	.75056	3
	50%	14.6333	1.23423	3
	Total	13.6111	1.57595	9
fraksi air	12,5%	8.8000	.17321	3
	25%	12.7333	.23094	3
	50%	13.1333	.75056	3
	Total	11.5556	2.11253	9
Total	12,5%	9.4250	1.46109	12
	25%	12.1167	1.87415	12
	50%	12.5083	1.74380	12
	Total	11.3500	2.15930	36

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable:diameterhambat

F	df1	df2	Sig.
4.387	11	24	.001

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + perlakuan + konsentrasi + perlakuan * konsentrasi

Keterangan : nilai (signifikansi) sig. 0,001 dimana $< 0,05$ sehingga bisa dikatakan varian antar group sama secara signifikan.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:diameterhambat

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	156.523 ^a	11	14.229	51.226	.000
Intercept	4637.610	1	4637.610	16695.396	.000
perlakuan	82.734	3	27.578	99.281	.000
konsentrasi	67.622	2	33.811	121.719	.000
perlakuan * konsentrasi	6.167	6	1.028	3.700	.010
Error	6.667	24	.278		
Total	4800.800	36			
Corrected Total	163.190	35			

a. R Squared = .959 (Adjusted R Squared = .940)

Keterangan:

Corrected model : (sig) $< 0,05$ artinya model valid
 Intercept : (sig) $< 0,05$ artinya intercept signifikan
 Perlakuan : (sig) $< 0,05$ artinya tidak berpengaruh signifikan
 Konsentrasi : (sig) $< 0,05$ artinya tidak berpengaruh signifikan
 Perlakuan*Konsentrasi: (sig) $< 0,05$ artinya berpengaruh signifikan
 Error : nilai error model, semakin kecil maka model semakin baik
 R Squared : 0,959 dimana mendekati 1, berarti korelasi kuat

Estimated Marginal Means

1. perlakuan

Dependent Variable:diameterhambat

perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
ekstrak	10.822	.176	10.460	11.185
fraksi n-heksana	9.411	.176	9.049	9.774
fraksi etil asetat	13.611	.176	13.249	13.974
fraksi air	11.556	.176	11.193	11.918

2. konsentrasi

Dependent Variable:diameterhambat

konsentrasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
12,5%	9.425	.152	9.111	9.739
25%	12.117	.152	11.803	12.431
50%	12.508	.152	12.194	12.822

3. perlakuan * konsentrasi

Dependent Variable:diameterhambat

perlakuan	konsentrasi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
ekstrak	12,5%	8.900	.304	8.272	9.528
	25%	11.733	.304	11.105	12.361
	50%	11.833	.304	11.205	12.461
fraksi n-heksana	12,5%	8.233	.304	7.605	8.861
	25%	9.567	.304	8.939	10.195
	50%	10.433	.304	9.805	11.061
fraksi etil asetat	12,5%	11.767	.304	11.139	12.395
	25%	14.433	.304	13.805	15.061
	50%	14.633	.304	14.005	15.261
fraksi air	12,5%	8.800	.304	8.172	9.428
	25%	12.733	.304	12.105	13.361
	50%	13.133	.304	12.505	13.761

Post Hoc Tests

Konsentrasi

Multiple Comparisons

Diameterhambat
Tukey HSD

(I) konsentr asi	(J) konsentr asi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
12,5%	25%	-2.6917*	.21517	.000	-3.2290	-2.1543
	50%	-3.0833*	.21517	.000	-3.6207	-2.5460
25%	12,5%	2.6917*	.21517	.000	2.1543	3.2290
	50%	-.3917	.21517	.184	-.9290	.1457
50%	12,5%	3.0833*	.21517	.000	2.5460	3.6207
	25%	.3917	.21517	.184	-.1457	.9290

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .278.

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

Keterangan : tanda (*) artinya ada perbedaan yang signifikan

Homogeneous Subsets

diameterhambat

Tukey HSD^{a,b}

konsentr asi	N	Subset	
		1	2
12,5%	12	9.4250	
25%	12		12.1167
50%	12		12.5083
Sig.		1.000	.184

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

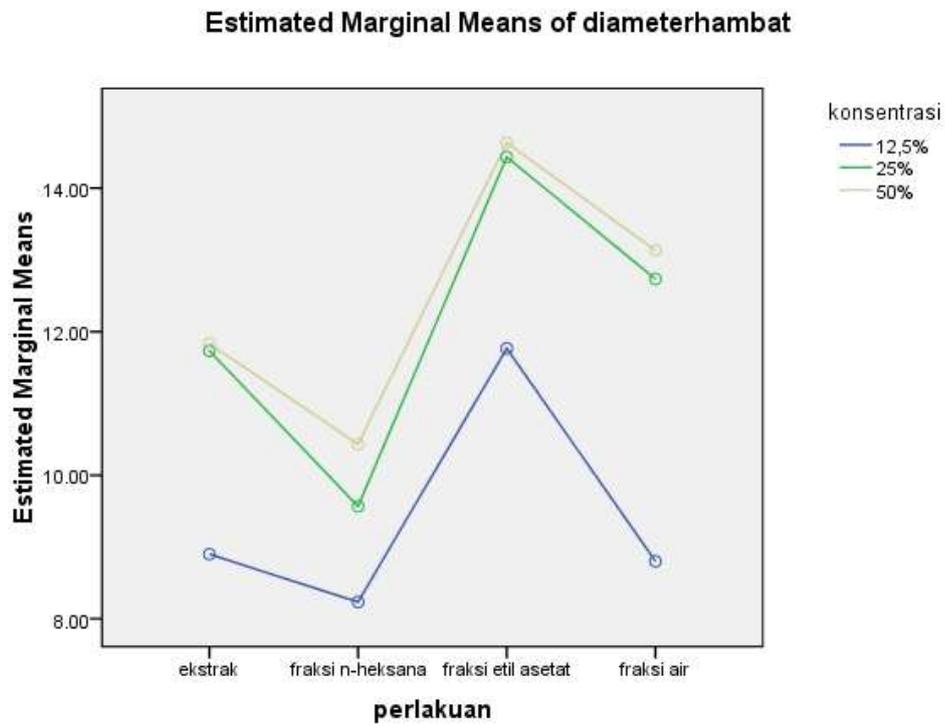
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .278.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b. Alpha = .05.

Profile Plots



Keterangan :

- fraksi etil asetat menunjukkan adanya diameter hambat tertinggi pada konsentrasi 50%