

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA,
ETIL ASETAT, DAN AIR DARI DAUN BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)
TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 13311**



Oleh:

**Widia Agustina
20144300A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA,
ETIL ASETAT, DAN AIR DARI DAUN BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)
TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 13311**

SKRIPSI

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



**Widia Agustina
20144300A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA,
ETIL ASETAT, DAN AIR DARI DAUN BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)
TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 13311**

Oleh :

Widia Agustina
20144300A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
Pada tanggal : 09 Juli 2017

Mengetahui ,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan

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

Pembimbing

Dr. Drs. Supriyadi, M.Si.
Pembimbing Pendamping,

Dra. Kartinah Wiryoendjoyo, SU.

Penguji :

1. Dr. Titik Sunarni, S.Si., M.Si., Apt. 1.....

2. D. Andang Arif Wibawa, SP., M.Si. 2.....

3. Ismi Rahmawati, M.Si., Apt. 3.....

4. Dr. Drs. Supriyadi, M.Si. 4.....

LEMBAR PERSEMBAHAN

“Sesungguhnya, atas kehendak Allah semua ini terwujud, tiada kekuatan kecuali dengan pertolongan Allah” (QS. Al-Kahfi : 39)

Yang utama dan paling utama

Alhamdulillah, puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan nikmat yang tak terukur, memberikan ilmu yang bermanfaat. Sholawat dan salam bagi Rasulullah Muhammad SAW.

Tercinta, tersayang, dan terkasih

Untuk kedua orang tua ku bapak (Murtaki) dan ibu (Sriwanti), yang telah susah payah dengan tulus, tanpa keluh memeras keringat untuk anakmu yang berjuang menjadi seorang

sarjana. Untuk kakak ku (Heryanto dan Rani Setyaningsih) yang selalu memberikan dukungan dan semangat selama ini. Kalian adalah semangat terbesar dalam hidupku.

“Sesungguhnya bersama kesukaran itu ada keringanan. Karena itu bila kau sudah selesai (mengerjakan yang lain). Dan berharaplah kepada Tuhanmu” (Q, S Al Insyirah : 6-8)

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang sepengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dalam naskah ini dan disebut dalam daftar pustaka. Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian, karya ilmiah, atau skripsi orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi baik secara akademis ataupun hukum. Demikian pernyataan ini saya buat dengan semestinya.

Surakarta, 2017



Widia Agustina

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul “**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI DAUN BIDARA (*Zizyphus mauritina* Lamk.) TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 13311**”. Skripsi ini disusun sebagai sebuah proses pembelajaran dan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan jenjang pendidikan Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini terdapat hal-hal yang kurang sempurna, sehubungan dengan keterbatasan penulis. Walaupun demikian, penulis telah berusaha semaksimal mungkin agar isi dalam skripsi ini dapat bermanfaat penulis dan pembaca.

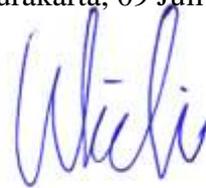
Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada :

1. Dr. Djoni Taringan, MBA, selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Dwi Ningsih, S.Si., M.Farm., Apt, selaku pembimbing akademik yang senantiasa membimbing dan memberi nasihat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
4. Dr. Drs. Supriyadi, selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu dalam membimbing, menasehati, mengarahkan dan memberikan semangat pada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Dra. Kartinah Wiryosoendjoyo, SU. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu dalam membimbing dan keikhlasannya dalam memberikan ilmu serta semangat kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

6. Segenap dosen dan staf laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta yang telah membantu dan membimbing penulis selama melaksanakan penelitian.
7. Bapak, ibu, kakak, dan semua keluargaku yang telah memberikan semangat kepadaku sejak masuk di bangku perkuliahan hingga akhir semester ini.
8. Teman-teman yang tidak bisa disebutkan satu-persatu, selalu mendukung dan membantu hingga skripsi ini selesai.

Semoga Allah SWT memberikan limpahan rahmat-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih ada kekurangan serta kesalahan yang tidak disadari penulis. Penulis mengharapkan saran dan kritik dari pembaca, demi kebaikan penulisan selanjutnya dimasa yang akan datang. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kefarmasian.

Surakarta, 09 Juli 2017



Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
PENGESAHAN PENELITIAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xiv
ABSTRAK.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Kegunaan Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Tanaman Bidara.....	5
1. Sistematik tanaman.....	5
2. Nama lain	5
3. Morfologi tumbuhan.....	5
4. Kandungan kimia	6
4.1 Alkaloid.....	6
4.2 Flavonoid.	6
4.3 Tanin.	6
4.4 Saponin.	7
5. Kegunaan tanaman	7
B. Simplisia	7
1. Pengertian simplisia	7

2.	Pengumpulan simplisia.....	8
3.	Pemilihan simplisia	8
4.	Pengeringan simplisia.....	8
C.	Penyarian	9
1.	Pengertian ekstrak	9
2.	Pengertian penyarian	9
3.	Metode maserasi.....	9
4.	Fraksinasi.....	9
5.	Pelarut.....	10
D.	<i>Salmonella typhi</i>	11
1.	Klasifikasi <i>Salmonella typhi</i>	11
2.	Morfologi dan struktur bakteri	11
3.	Identifikasi bakteri.....	12
4.	Patogenesis	12
E.	Antibakteri.....	13
1.	Mekanisme kerja antibakteri	13
1.1	Penghambat metabolisme sel.....	13
1.2	Penghambat sintesis dinding sel.	13
1.3	Penghambat keutuhan membran sel.....	13
1.4	Penghambat sintesis protein.....	14
1.5	Penghambat sintesis asam nukleat.	14
F.	Uji Aktivitas Antibakteri	14
1.	Metode difusi.....	14
2.	Metode dilusi.....	14
G.	Siprofloksasin	15
H.	Media.....	15
I.	Sterilisasi	16
J.	Landasan Teori	16
K.	Hipotesis	18
 BAB III METODE PENELITIAN.....		20
A.	Populasi dan Sampel.....	20
1.	Populasi	20
2.	Sampel	20
B.	Variabel Penelitian	20
1.	Identifikasi variabel utama	20
2.	Klasifikasi variabel utama.....	20
3.	Definisi operasional variabel utama	21
C.	Bahan dan Alat	22
1.	Bahan.....	22
2.	Alat	22
D.	Jalannya Penelitian	22
1.	Determinasi tanaman.....	22
2.	Pembuatan serbuk daun bidara.....	23
3.	Penetapan susut pengeringan serbuk daun bidara	23

4.	Pembuatan ekstrak etanol	23
5.	Uji bebas etanol	24
6.	Fraksinasi.....	24
7.	Pengujian kandungan kimia	24
7.1	Identifikasi alkaloid.	24
7.2	Identifikasi flavonoid.....	24
7.3	Identifikasi tanin.	24
7.4	Identifikasi saponin.....	25
8.	Sterilisasi	25
9.	Identifikasi bakteri uji	25
10.	Uji biokimia.....	26
11.	Pembuatan suspensi bakteri uji	26
12.	Pengujian aktivitas antibakteri daun bidara secara difusi	27
13.	Pengujian aktivitas antibakteri daun bidara secara dilusi.....	27
E.	Analisis Hasil.....	28
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		34
1.	Determinasi tanaman bidara (<i>Ziziphus mauritiana</i>).....	34
2.	Pembuatan serbuk daun bidara	34
3.	Penetapan susut pengeringan.....	35
4.	Pembuatan ekstrak etanol daun bidara	35
5.	Uji bebas etanol	36
6.	Fraksinasi.....	37
7.	Pengujian kandungan.....	38
8.	Identifikasi bakteri uji	38
9.	Uji biokimia.....	40
10.	Pengujian aktivitas antibakteri daun bidara secara difusi.....	42
11.	Pengujian aktivitas antibakteri daun bidara secara dilusi.....	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		48
A.	Kesimpulan	48
B.	Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA		49
LAMPIRAN.....		53

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. (a)Tanaman bidara (<i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk.) (b) daun bidara (<i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk.) (Parmar <i>et al.</i> 2012).....	5
Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun bidara (<i>Zizyphus maurutiana</i> Lam.).....	29
Gambar 3. Skema uji aktivitas antibakteri.	30
Gambar 4. Pembuatan suspensi bakteri.	31
Gambar 5. Skema pengujian antibakteri dengan metode difusi terhadap <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311.	32
Gambar 6. Skema pengujian antibakteri dengan metode dilusi terhadap <i>Salmonella typhi</i> ATCC 13311.	33
Gambar 7. Identifikasi secara makroskopis	39
Gambar 8. Identifikasi bakteri dengan pewarnaan.....	40
Gambar 9. Identifikasi biokimia	41

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun bidara	35
Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun bidara.....	35
Tabel 3. Hasil persen rendemen ekstrak etanol daun bidara.	36
Tabel 4. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun bidara.....	36
Tabel 5. Hasil persen rendemen fraksinasi daun bidara.....	37
Tabel 6. Hasil pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak, dan fraksi daun bidara	38
Tabel 7. Hasil identifikasi uji biokimia pada <i>S. typhi</i> ATCC 13311.....	42
Tabel 8. Hasil diameter hambat uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun bidara metode difusi	43
Tabel 9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun bidara metode dilusi	46

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Determinasi tanaman bidara (<i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk.)	54
Lampiran 2. Foto daun dan serbuk daun bidara (<i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk.)..	55
Lampiran 3. Gambar alat yang digunakan	56
Lampiran 4. Gambar ekstrak etanol, proses fraksinasi, hasil fraksinasi, dan larutan stok.	57
Lampiran 5. Gambar identifikasi kandungan senyawa kimia pada serbuk, ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, air dari daun bidara	58
Lampiran 6. Foto hasil difusi	59
Lampiran 8. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun bidara.	63
Lampiran 9. Perhitungan persen rendemen ekstrak	64
Lampiran 10. Perhitungan persen rendemen fraksinasi daun bidara.	65
Lampiran 11. Perhitungan dan pembuatan konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi daun bidara metode difusi	66
Lampiran 12. Perhitungan pembuatan konsentrasi fraksi teraktif (fraksi etil asetat) daun bidara metode dilusi.....	67
Lampiran 13. Hasil analisis Tukey dan tabel <i>Homogeneous Subsets</i>	69
Lampiran 14. Formulasi dan pembuatan media.....	73

INTISARI

Agustina, W., 2017, UJII AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI DAUN BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 13311. SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Tanaman bidara dalam pengobatan tradisional digunakan masyarakat untuk mengobati berbagai penyakit seperti flu, kejang, dan gangguan pencernaan pada anak. Analisis fitokimia ekstrak metanol daun bidara mengandung saponin, tanin, alkaloid, flavonoid, terpenoid, senyawa fenolik. Tanin dapat digunakan sebagai antimikroba dan antioksidan. Saponin dapat digunakan sebagai antikanker, antijamur, anti inflamasi, dan antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dan ekstrak etanol 70% daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Serbuk daun bidara di ekstraksi metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, dilanjutkan fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan air. Aktivitas antibakteri fraksi dan ekstrak diuji menggunakan metode difusi dan dilusi. Uji dilusi menggunakan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%. Senyawa paling efektif dilanjutkan dengan metode dilusi. Bakteri uji menggunakan *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun bidara mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311. Fraksi etil asetat konsentrasi 50% memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dengan diameter hambat sebesar 14 mm dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sekitar 12,5% terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Kata kunci: *Zizyphus mauritiana* Lamk., *Salmonella typhi* ATCC 13311, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air.

ABSTRAK

Agustina, W., 2017, ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF ETHANOL EXTRAT, *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE, AND WATER FRACTION OF LEAF BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) AGAINST *Salmonella typhi* ATCC 13311. THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA

The bidara plant (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) in traditional medicines can be used to treat a variety of ailments flu, convulsions, and malnutrition related diseases in children. Phytochemical analysis of methanolic extract of bidara leaves contains saponin, tannins, flavonoids, terpenoids, phenolic compounds. Tannins can be used antimicrobial and antioxidant. Saponin can be used anticancer, antifungal, antiinflammatory, and antibacterial. This study aims to determine of activity of the fraction of *n*-hexsane, ethyl acetat, water and ethanol extract of bidara leaf's as antibacterial *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Bidara leaf (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) was extraced by maceration method used ethanol 70%, than fractionation used *n*-hexsane, ethyl acetat, and water solvents. Antibacterial activity fraction and extraction was tested for diffution method and dilution methode. Diffution methode with serial concentrations of 50%; 25%; 12,5%. The most effective compounds than tested with dilution. Bacteria test using *Salmonella typhi* ATCC 13311.

The results showed that ethanol extract, fraction of *n*-hexsane, ethyl acetat, and water from bidara leaf had antibacterial activity against *Salmonella typhi* ATCC 13311. Concentration of 50% ethyl acetat fraction had the most effective antibacterial activity with inhibitory diameter of 14 mm and Minimum Kill Concentration (MKC) of 12,5 % against *Salmonella typhi* ATCC 13311 bacteria.

Keywords: *Zizyphus mauritiana* Lamk., *Salmonella typhi* ATCC 13311, fraction *n*-hexsane, fraction ethyl acetat, fraction water.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan ancaman yang besar untuk umat manusia. Infeksi ditimbulkan karena adanya agen infeksius yang menyerang tubuh manusia, baik secara langsung maupun melalui perantara. Agen infeksius dapat berupa bakteri, virus, jamur, parasit (Arias 2003). Salah satu contoh bakteri Gram negatif yang dapat menyebabkan infeksi adalah *Salmonella typhi*.

Salmonella typhi merupakan bakteri Gram negatif penyebab utama demam tifoid. Demam tifoid adalah jenis penyakit yang berkaitan dengan demam yang disebabkan oleh adanya infeksi bakteri yang menyebar keseluruh tubuh dan mempengaruhi organ (Cita 2011). Infeksi terjadi secara oral melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi, secara umum demam tifoid dijumpai dalam suatu area dengan kondisi sanitasi buruk dan memiliki keterbatasan memperoleh air bersih. *Salmonella typhi* dapat tetap terbawa dalam tubuh penderita dan terus-menerus keluar bersama feses. Bakteri yang keluar bersama feses dapat bertahan lama di alam menjadi sumber penularan (Amarantini *et al.* 2009).

Gejala demam tifoid sangat bervariasi mulai dari keadaan sakit ringan disertai sedikit demam, badan terasa tidak enak, batuk sampai pada keadaan klinis yang berat seperti nyeri abdominal, dan komplikasi. Kondisi ini sering menyebabkan kesulitan dalam menegakkan diagnosis demam tifoid apabila hanya berdasarkan gambaran klinis (Amarantini *et al.* 2009).

Seiring dengan kemajuan zaman, ditemukan beberapa antibiotik generasi pertama untuk mengobati demam tifoid, seperti kloramfenikol, kotrimokazol, dan ampicilin sehingga prevalensi demam tifoid dapat berkurang. Akan tetapi, dengan seiringnya digunakan antibiotik tersebut untuk mengobati penyakit demam tifoid, yang menyebabkan bakteri *Salmonella typhi* menjadi resisten terhadap antibiotik (Nelwan 2012).

Penggunaan antibiotik yang tidak sesuai dengan langkah-langkah rasional dan konsisten, akan menimbulkan efek samping dan resistensi bakteri terhadap

antibiotik. Penemuan produk baru yang berpotensi sebagai antibakteri sangat diperlukan untuk mengatasi masalah infeksi. Pengalihan pengobatan dari penggunaan obat-obatan *modern* seperti antibiotik ke pengobatan tradisional dengan menggunakan tumbuhan berkhasiat sebagai antibakteri, diharapkan dapat mengatasi masalah infeksi dan mengurangi masalah.

Upaya mencari pengobatan infeksi adalah dengan penggunaan obat tradisional. Senyawa alami yang berpotensi sebagai antibakteri umumnya mengandung tanin, polifenol, glikosida, resin, dan saponin (Ernawati & Sari 2015). Indonesia merupakan negara yang memiliki ribuan jenis tumbuhan yang sebagian besar dapat digunakan sebagai obat tradisional. Hal ini menandakan adanya kesadaran masyarakat untuk kembali dalam rangka mencapai kesehatan yang optimal dan untuk mengatasi berbagai penyakit secara alami (Kusuma 1993).

Salah satu tanaman tradisional yang memiliki aktivitas antibakteri adalah tanaman bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.). Tanaman bidara dalam pengobatan tradisional digunakan masyarakat untuk mengobati berbagai penyakit seperti flu, kejang, dan gangguan pencernaan pada anak. Daun dapat digunakan sebagai pengobatan diare, penyakit hati, demam, dan untuk luka. Buah digunakan untuk obat penenang dan obat antikanker (Sivasankari & Sankaravadivoo 2015).

Muhamed *et al.* (2016) menyampaikan bahwa daun bidara dapat digunakan sebagai antioksidan, antimikroba, antidiare, antidiabetik, hepatoprotektif dan antikanker. Analisis fitokimia ekstrak metanol daun bidara mengandung saponin, tanin, alkaloid, flavonoid, terpenoid, senyawa fenolik. Tanin dapat digunakan sebagai antimikroba dan antioksidan. Saponin dapat digunakan sebagai antikanker, antijamur, anti inflamasi, dan antibakteri. Penelitian ini dapat membentuk dasar untuk studi lebih lanjut dalam mengoptimalkan ekstrak herbal dan untuk lebih mengevaluasi tanaman terhadap bakteri (Sivasankari & Sankaravadivoo 2015).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun bidara yang berpotensi sebagai antibakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 menggunakan metode dilusi dan difusi. Metode dilusi dan difusi untuk mendapatkan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi

Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol serbuk daun bidara.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

Pertama, apakah ekstrak etanol dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311?

Kedua, ekstrak etanol dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) tersebut manakah yang paling efektif dalam menghambat *Salmonella typhi* ATCC 13311?

Ketiga, berapa Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

Pertama, untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Kedua, untuk mengetahui ekstrak etanol dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) tersebut yang paling efektif dalam menghambat *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Ketiga, untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengungkapkan lebih lanjut tentang aktivitas daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) sebagai antibakteri, sehingga dapat dikembangkan dan dibudidayakan sebagai tanaman yang memiliki manfaat salah satunya sebagai antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Penelitian ini juga diharapkan dapat ikut berperan dalam perkembangan ilmu pengetahuan dan penemuan obat tradisional baru yang memiliki aktivitas antibakteri dan dapat memberikan landasan ilmiah bagi pihak penelitian selanjutnya.

BAB II

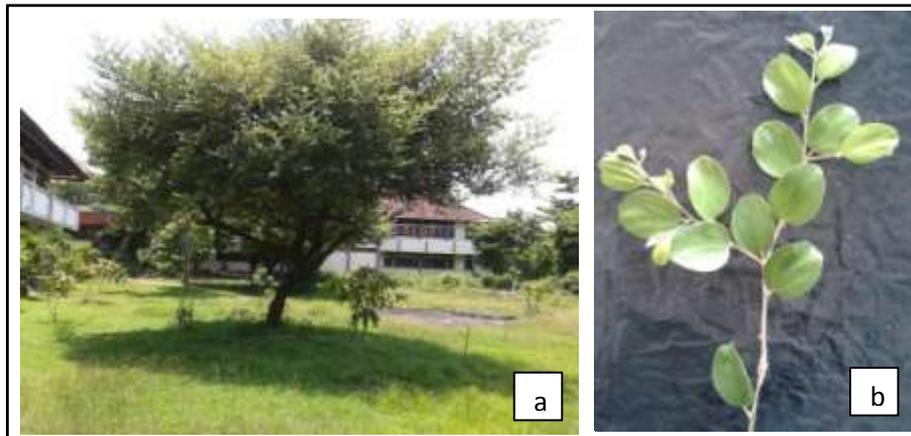
TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Bidara

1. Sistematik tanaman

Klasifikasi menurut Upadhyay *et al.* (2011):

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Klas : Magnoliopsida
Ordo : Rosales
Famili : Rhamnaceae
Genus : *Ziziphus*
Spesies : *Ziziphus mauritiana* Lamk.



Gambar 1(a) Tanaman bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) (b) daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) (Parmar *et al.* 2012).

2. Nama lain

Bidara yang memiliki nama latin *Zizyphus mauritiana* Lamk. dikenal dengan beberapa nama daerah yaitu widara (Jawa, Sunda), ranga (Bima), kalanga (Sumba) dan bekul (Bali) (Heyne 1987).

3. Morfologi tumbuhan

Zizyphus mauritiana Lamk. adalah pohon berduri dengan tinggi hingga 15 m, diameter batang 40 cm atau lebih. Kulit batang abu-abu gelap atau hitam,

pecah-pecah tidak beraturan. Daun tunggal dan berselang-seling, memiliki panjang 4-6 cm dan lebar 2,5-4,5 cm. Tangkai daun berbulu dan pada pinggiran daun terdapat gigi yang sangat halus. Buah berbiji satu, bulat sampai bulat telur, ukuran kira-kira 6x4 cm, kulit buah halus atau kasar, mengkilap, berwarna kekuningan sampai kemerahan atau kehitaman, daging buah putih, renyah, agak asam hingga manis (Goyal *et al.* 2012).

4. Kandungan kimia

Berdasarkan penelitian Mohamed *et al.* (2016) pada uji fitokimia ekstrak metanol daun bidara mengandung saponin, tanin, alkaloid, flavonoid, terpenoid, senyawa fenolik.

4.1 Alkaloid. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Alkaloid dapat ditemukan dalam berbagai bagian tumbuhan seperti biji, daun, ranting, dan kulit batang. Alkaloid umumnya ditemukan dalam kadar yang kecil dan harusnya dipisahkan dari campuran senyawa yang lain yang berasal dari tumbuhan (Herbert 1996).

4.2 Flavonoid. Flavonoid merupakan golongan fenol alam yang melingkari 15 atom karbon inti dasar. Flavonoid tersusun dalam konfigurasi $C_6-C_3-C_6$ yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan-satuan yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Markham 1988). Metanol, etanol 70%, aseton merupakan pelarut yang sering digunakan untuk ekstraksi flavonoid. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dalam merusak membran sel yaitu membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler sehingga membran bakteri rusak dan diikuti dengan masuknya air yang tidak terkontrol ke dalam sel bakteri, hal ini menyebabkan pembengkakan dan akhirnya membran sel bakteri pecah (Ernawati & Sari 2015).

4.3 Tanin. Tanin merupakan suatu zat kompleks yang terdapat campuran polifenol yang sukar dipisahkan, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit, pertahanan bagi tumbuhan, membantu mengusir hewan pemangsa tumbuhan, antioksidan, menghambat pertumbuhan tunas dan

dapat mendenaturasi protein. Tanin larut dalam air tapi tidak larut dalam pelarut organik nonpolar (Robinson 1995).

4.4 Saponin. Saponin adalah glikosida triterpen dan sterol yang telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemodialisis sel darah (Harborne 1987). Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membrane sel bakteri, yang menyebabkan komponen penting bakteri seperti protein, asam nukleat dan nukleotida keluar sehingga bakteri menjadi lisis (Alamsyah 2014).

5. Kegunaan tanaman

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

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia merupakan bahan alamiah yang digunakan untuk obat yang belum mengalami perubahan apapun, 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 lain yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa senyawa murni (Depkes 1985).

2. Pengumpulan simplisia

Simplisia yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia nabati yaitu bagian daun. Kadar senyawa aktif daun satu simplisia berbeda-beda tergantung pada bagian tanaman yang digunakan, umur tanaman, bagian tanaman, waktu panen dan lingkungan tempat tumbuh (Depkes 1985).

3. Pemilihan simplisia

Pemilihan simplisia digunakan untuk memisahkan simplisia dari partikel asing yang merugikan. Simplisia nabati harus bebas dari serangga dan kotoran hewan, bau dan warna tidak boleh menyimpang, tidak boleh mengandung lendir atau adanya tanda-tanda pengotor lain serta tidak boleh berbahaya dan beracun (Depkes 1989).

4. Pengeringan simplisia

Bahan tanaman yang sudah dikumpulkan dilakukan pencucian pada air bersih yang mengalir. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotor yang melekat pada bahan simplisia. Pencucian dapat mengurangi mikroba pada simplisia tetapi tidak dapat membersihkan simplisia dari semua mikroba air yang digunakan untuk mencuci biasanya mengandung sejumlah mikroba. Bahan simplisia yang mengandung zat mudah larut dalam air maka pencuciannya dilakukan dalam waktu sesingkat mungkin (Depkes 1985).

Cara pengeringan dibedakan menjadi dua metode yaitu pengeringan dalam udara terbuka dan pengeringan dalam panas buatan. Pengeringan dalam udara terbuka dapat dilakukan dibawah sinar matahari langsung atau terlindungi dari cahaya yaitu diangin-anginkan, hal ini tergantung bahan tumbuhan yang akan dikeringkan, pada pengeringan dengan sinar matahari langsung akan menyebabkan terjadinya penguraian bahan berkhasiat. Pelaksanaan pengaturan pengeringan ditentukan dari bentuk atau bagian bahan yang akan dikeringkan. Bagian yang tipis seperti bunga dan daun tidak perlu dipotong, pada bagian yang keras seperti akar, biji, batang, kayu, dan kulit buah sebaiknya dipotong terlebih

dahulu. Pengeringan untuk daun yang paling baik adalah dengan cara diangin-anginkan atau terlindung dari sinar matahari langsung. Pengeringan menggunakan panas buatan adalah pengeringan menggunakan mesin pemanas bertenaga listrik atau diesel. Mesin pengering, panas yang dihasilkan stabil, pengeringan lebih terkontrol, tidak tergantung lagi pada cuaca, dan waktu yang dibutuhkan sedikit. Kualitas simplisia yang dihasilkan akan lebih baik (Depkes 1985).

C. Penyarian

1. Pengertian ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pelarut atau cairan yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstrak berdasarkan konsistensinya dibedakan menjadi tiga, yaitu ekstrak cair, ekstrak kental, ekstrak kering. Ekstrak cair merupakan sediaan air cair hasil dari penyarian simplisia. Ekstrak kental merupakan sediaan kental yang dibuat dari simplisia kemudian diuapkan pelarutnya. Ekstrak kering merupakan sediaan yang terbentuk bubuk yang dibuat dari hasil tarikan simplisia yang diuapkan dengan pelarut hingga kering (Voigt 1995).

2. Pengertian penyarian

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 diinginkan dari zat aktif dan seminimal mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel 1989).

3. Metode maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengojokan dengan suhu ruangan. Prinsip metode ini adalah pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengojokan yang terus-menerus. (Depkes 2000).

4. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pemisahan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran suatu seyawa.

Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan terlarut dalam pelarut polar, begitu pula sebaliknya senyawa-senyawa nonpolar akan terlarut dalam pelarut nonpolar. Mula-mula ekstrak difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Masing-masing pelarut selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut berdasarkan perbedaan kepolarannya, mula-mula disari dengan pelarut polar (Harborne 1987).

5. Pelarut

Pelarut adalah zat yang digunakan untuk melarutkan suatu zat lain dalam preparat larutan (Ansel 1989). Pemilihan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi dari bahan obat tertentu berdasarkan daya larut yang aktif, zat yang tidak aktif serta zat yang tidak diinginkan tergantung preparat yang digunakan (Ansel 1989). Pelarut atau cairan penyari terdiri menjadi 3 macam yaitu pelarut polar, pelarut semipolar, pelarut nonpolar, salah satu contoh pelarut atau cairan penyari adalah air, etanol, air-etanol (List and Schmidt 2000).

Etanol merupakan larutan serbaguna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan agar diperoleh hasil yang baik, penyarian biasanya digunakan campuran antara etanol dan air. Penggunaan etanol 70% dipertimbangkan karena lebih efektif dalam menghasilkan jumlah bahan yang optimal dan bahan yang diperlukan hanya sedikit yang turut kedalam pengekstraksi (List and Schmidt 2000).

Etanol 70% dapat melarutkan senyawa seperti tanin, alkaloid basa, saponin, minyak atsiri, kurkumin, antrakuinon, flavonoid, steroid, dan glikosida. Etanol 70% tidak menyebabkan pembengkakan sel, namun dapat memperbaiki stabilitas bahan yang optimal, sehingga bahan pengotor hanya dalam skala kecil turut dalam cairan pengekstraksi. Keuntungan lain adalah sifatnya yang mampu menghambat kerja enzim (Voigt 1995). Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, kurkumin, antrakinon, flavonoid, steroid dan klorofil. Etanol digunakan sebagai cairan penyarian karena lebih spesifik, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorbsinya baik, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit (Depkes 1989).

Pelarut *n*-heksana merupakan pelarut nonpolar berupa cairan yang jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar, dan mempunyai bau seperti petroleum, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol, *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa nonpolar, alkaloid, karotenoid, klorofil, dan resin (Depkes 1987).

Etil asetat merupakan pelarut semipolar, mudah terbakar dan menguap, maka penyiapannya dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas. Etil asetat merupakan suatu larutan 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)

Air dimanfaatkan sebagai penyari karena murah, mudah diperoleh, stabil, tidak mudah menguap dan terbakar, tidak beracun serta alamiah. Air dapat melarutkan gula, pati, protein, enzim, lilin, lemak, peptida, minyak menguap, garam alkaloid, zat warna dan asam organik (List & Schmidt 2000).

D. *Salmonella typhi*

1. Klasifikasi *Salmonella typhi*

Sistematika *salmonella typhi* sebagai berikut (Jawetz *et al.* 2005):

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Ordo	: Gamma Proteobacteria
Class	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteria
Genus	: Salmonella
Spesies	: <i>Salmonella typhi</i>

2. Morfologi dan struktur bakteri

Salmonella typhi merupakan bakteri batang Gram negatif, tidak memiliki spora, bergerak dengan flagel peritrik. Berukuran berkisar antara 0,7-1.5 X 2-5 µm, memiliki antigen O (antigen somatik) merupakan bagian pada struktur pembentuk dinding sel bakteri, antigen H terdiri dari protein yang disebut flagellia

dan bersifat termolabil, antigen Vi merupakan polisakarida yang terdapat pada permukaan bakteri.

Bakteri ini tahan terhadap selenit dan natrium deoksikolat yang dapat membunuh bakteri enterik lain, menghasilkan endotoksin, protein invasin dan Mannosa Resistent Haemagglutinin (MRHA). *Salmonella typhi* mampu bertahan hidup selama berberapa bulan sampai tahun jika melekat pada feses, mentega, susu, keju dan air beku. *Salmonella typhi* adalah parasit intraseluler fakultatif, yang dapat hidup dalam makrofag dan menyebabkan gejala-gejala infeksi lambung, biasanya sesudah demam yang lama, bakterinemia dan akhirnya lokalisasi infeksi dalam jaringan limfoid sub mukosa usus kecil (Cita 2011)

3. Identifikasi bakteri

Salmonella typhi mudah tumbuh pada medium sederhana, tetapi hampir tidak pernah memfermentasi laktosa atau sukrosa. Bakteri ini membentuk asam terkadang membentuk gas dari glukosa dan manosa. *Salmonella typhi* umumnya menghasilkan H₂S. Organisme ini dapat bertahan hidup pada air yang beku untuk periode yang lama. *Salmonella typhi* resisten terhadap zat kimia tertentu (misalnya *brilian green*, natrium tetrathionat, natrium deoksikolat) yang menghambat bakteri enterik lain, maka penambahan zat tersebut dalam medium bermanfaat untuk mengisolasi *Salmonella typhi* dari feses (Jawetz *et al.* 2012).

4. Patogenesis

Salmonellosis adalah infeksi yang disebabkan oleh *Salmolella* yang masuk ke dalam tubuh melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi. Setelah 12-72 jam terinfeksi akan timbul gejala demam, kram perut, pusing dan mual. Gejala ini dapat berlangsung selama 7 hari. Virulensi *Salmonella* disebabkan oleh: kemampuan menginvasi sel-sel epitel inang, mempunyai antigen permukaan yang terdiri dari atas sampai lipopolisakarida, kemampuan melakukan replikasi intraseluler, menghasilkan beberapa toksin spesifik, kemampuan berkolonisasi pada ileum dan kolon, kemampuan menginvasi lapisan epitel intestine dan berkembang dalam sel-sel limfoid (Radji 2010).

E. 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, bakteristatik, antiseptic, desinfektan (Pelczar *et al.* 2009). Germisid adalah bahan yang dipakai untuk membasmi mikroorganisme dengan mematikan sel-sel vegetatif, tetapi tidak selalu mematikan bentuk sporanya. Bakterisid adalah bahan yang dipakai untuk mematikan bentuk-bentuk vegetatif bakteri.

Bakteristatik adalah satu buah bahan yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri tanpa mematikan. Antiseptik adalah suatu bahan yang menghambat atau membunuh mikroorganisme dengan mencegah pertumbuhan atau menghambat aktivitas mikroorganisme, digunakan pada jaringan hidup.

1. Mekanisme kerja antibakteri

1.1 Penghambat 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 benzoate (PABA) untuk kehidupan. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikuti sertakan 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 kelompok ini ialah sulfonamid, trimetoprim dan asam p-aminosalisilat (Jawetz *et al.* 2005).

1.2 Penghambat Sintesis dinding sel. Dinding sel bakteri terdiri atas polipeptidoglikan yaitu suatu kelompok polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Jawetz *et al.* 2005).

1.3 Penghambat ketahanan membran sel. Membran 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 membrane sel mikroba. Kerusakan membrane sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Ganiswara 2005).

1.4 Penghambat sintesis protein. Bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini antara lain aktinomisin, rifampisin, streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, klindamisin dan gentamisin (Radji, 2010).

1.5 Penghambat sintesis asam nukleat. Antibakteri yang memiliki mekanisme kerja ini biasanya bersifat sitotoksik dan hanya digunakan sebagai antikanker tetapi dapat juga digunakan sebagai antivirus. Antibakteri yang bekerja merusak asam nukleat sel mikroba contohnya rifampisin, dan golongan kuinolon (Ganiswara 2005).

F. Uji Aktivitas Antibakteri

1. Metode difusi

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi. Metode difusi dilakukan dengan menggunakan cakram (*diks*) kertas saring, sumuran atau silinder tidak beralas. Metode cakram (*diks*) berisi sejumlah obat yang ditempatkan pada permukaan medium padat, medium sebelum diolesi bakteri uji. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat. (Jawetz *et al.* 2012). Keuntungan metode difusi dibandingkan metode dilusi yaitu lebih ekonomis, sederhana, mudah dibuat dan reproduibel.

2. Metode dilusi

Metode dilusi dilakukan dengan cara membuat seri konsentrasi dalam media. Hasil Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) diinokulasikan terhadap media uji, selanjutnya diinkubasi dan diamati konsentrasi antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji.

Keuntungan metode dilusi adalah memberikan hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al.* 2012).

G. Siprofloksasin

Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan quinolon. Siprofloksasin digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram negative-positif seperti *Echerichia coli*, *shigella*, *salmonella*, *staphylococcus*, *clostridium* (Meinisasti *et al.* 2015). Siprofloksasin merupakan antibiotik yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba (Sandika & Suwandi 2017).

Target utama obat ini adalah pada DNA girase. Kedua rantai DNA heliks harus dipisahkan untuk memungkinkan terjadinya replikasi atau transkripsi DNA. Pemisahan kedua untai tersebut menyebabkan terjadinya *supercoiling* (pembentukan gulungan DNA) positif yang berlebihan pada DNA tersebut (Goodman & Gilman 2007). Penggunaan antibiotik Siprofloksasin sebagai pembanding (kontrol positif) karena memiliki spectrum yang luas sebagai antibakteri (Meinisasti *et al.* 2015).

H. Media

Media adalah kumpulan zat organik untuk menumbuhkan bakteri dengan cara tertentu. Bakteri sebagai makhluk hidup mempunyai kebutuhan dasar yang sama meliputi air, karbon, energi, mineral dan faktor tumbuh. Keasaman (pH) medium sangat penting bagi pertumbuhan organisme terutama kerja enzim sangat dipengaruhi pH (Hadioetomo 1993).

Konsistensi media dapat dibuat bermacam-macam berdasarkan pada kebutuhannya. Media terdapat tiga bentuk yaitu media cair, padat dan setengah padat. Media cair (*liquid media*) dapat digunakan pembiakan organisasi dalam jumlah besar, fermentasi dan berbagai uji. Media padat (*solid media*) digunakan untuk mengamati bentuk dan morfologi koloni serta mengisolasi biakan murni.

Media setengah padat (*semisolid media*) digunakan untuk menguji ada atau tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi (Sriyanti dan Wijaya 2008).

Menurut Pratiwi (2008) media berdasarkan kandungan nutrisi dapat dibedakan menjadi beberapa macam yaitu: media sintetik, media kompleks, media penyubur, media selektif, media diferensial, media khusus. Media sintetik merupakan media yang komponen penyusunnya sudah diketahui atau ditentukan. Media ini biasanya digunakan dalam penelitian untuk mengetahui kebutuhan nutrisi mikroorganisme. Media kompleks merupakan media yang tersusun dari komponen yang secara kimia tidak diketahui dan umumnya diperlukan karena kebutuhan nutrisi mikroorganisme tertentu tidak diketahui. Contoh: media *MacConkey Agar*. Media umum merupakan media pendukung bagi banyak pertumbuhan mikroorganisme. Contoh: *Tryptic Soya Agar (TSA)*, *Tryptic Soya Broth (TSB)*.

Media penyubur merupakan media yang berguna untuk mempercepat pertumbuhan mikroorganisme tertentu. Media selektif merupakan media yang mendukung pertumbuhan mikroorganisme tertentu (seleksi) dengan menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang lain. Media diferensial digunakan untuk membedakan kelompok mikroorganisme dan bahkan dapat digunakan untuk identifikasi. Contoh media khusus adalah media anaerob. Media tersebut ditambahkan bahan yang dapat memproduksi kandungan O_2 dengan cara pengikatan kimiawi.

I. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang digunakan dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu 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 gelombang pendek seperti sinar-X, sinar α , sinar gamma, dan sinar UV. Sterilitas secara kimia yaitu

penggunaan desinfektan, larutan alkohol, dan larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu penggunaan saringan atau filter untuk bahan yang akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi (Darmadi 2008).

J. Landasan Teori

Penyakit typhus atau demam tifoid merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi* terutama menyerang bagian saluran pencernaan. Demam tifoid adalah penyakit infeksi akut yang selalu ada di masyarakat di Indonesia, mulai dari usia balita, anak-anak dan dewasa. Demam tifoid sebagai demam menular yang disebabkan oleh bakteri sehingga menyebabkan bintik-bintik merah di dada dan perut serta iritasi parah pada usus.

Pemberian antibiotik empiris yang tepat pada pasien demam tifoid sangat penting, untuk mencegah komplikasi dan untuk mengurangi kematian. Kloramfenikol, ampisilin, dan kotrimoksazol merupakan antibiotik yang telah dipakai selama puluhan tahun sampai timbulnya resistensi (Nelwan 2012).

Penyebab utama resistensi antibiotika adalah penggunaan yang meluas, penggunaan kurang tepat, peresepan, penggunaan monoterapi, perilaku hidup sehat, lemahnya pengawasan yang dilakukan pemerintah. Hal ini merupakan salah satu faktor pemicu terjadinya salah satu resisten (Utami 2011).

Tanaman obat merupakan sumber bahan obat tradisional telah digunakan secara turun temurun salah satu manfaat tanaman obat adalah sebagai zat antibakteri. Penggunaan obat tradisional secara umum dinilai lebih aman dari penggunaan obat modern, hal ini dikarenakan obat tradisional memiliki efek samping yang relatif sedikit dari obat modern (Juliantina 2008).

Indonesia kaya akan tanaman alam sebagai obat tradisional, diantaranya adalah tanaman bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.). *Zizyphus mauritiana* Lamk. memiliki khasiat obat, yang dikenali oleh adanya metabolit sekunder. *Zizyphus mauritiana* Lam. mengandung glikosida, flavonoid, alkaloid, dan terpenoid ada di tanaman ini. *Zizyphus mauritiana* Lamk. memiliki potensi obatnya sebagai

antibakteri, antijamur, antialergi, antiulkus, antiradang, dan antikanker (Beg *et al.* 2016).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sivasankari & Sankaravadivoo (2015) pada ekstrak etanol dan ekstrak metanol daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) memiliki aktivitas antimikroba terhadap mikroorganisme.

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

Uji difusi adalah suatu uji aktivitas dengan menggunakan cakram yang berliang renik atau sumur silinder tidak beralas yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada media yang ditanami dengan biakan bakteri yang akan diperiksa setelah inkubasi, garis tengah daerah hambatan jernih mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran hambatan terhadap bakteri yang diperiksa. Dasar penggunaannya adalah dalam terbentuk atau tidaknya zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekeliling cakram atau silinder yang berisi zat antimikroba (Harminta 2004).

Metode dilusi dilakukan untuk mengukur KHM dan KBM, cara yang dilakukan dengan membuat seri pengenceran antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM selanjutnya diinokulasikan pada media padat diinkubasi selama 37°C selama 18-24 jam. Media yang tidak ditumbuhi bakteri ditetapkan sebagai KBM.

K. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada maka hipotesis dalam penelitian ini:

Pertama, ekstrak etanol, fraksi (*n*-heksana, etil asetat dan air) dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Kedua, dari ekstrak etanol dan ketiga fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang memiliki aktivitas antibakteri paling efektif sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Ketiga, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) mempunyai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang berasal dari Singaraja, Bali diambil pada bulan Januari 2018.

2. Sampel

Sampel daun merupakan simplisia nabati daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang diambil secara acak dengan ciri-ciri setengah tua, tidak terserang hama, dan tidak cacat.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variable utama

Variabel utama pertama dalam penelitian adalah ekstrak dengan pelarut etanol 70% daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.), fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air.

Variabel utama kedua dalam penelitian adalah aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun bidara dengan metode difusi dan dilusi terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

2. Klasifikasi variable utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang biasanya diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah berbagai variasi konsentrasi dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.).

Variabel tergantung adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam metode ini adalah pertumbuhan bakteri

Salmonella typhi ATCC 13311 di media uji yang dipengaruhi oleh ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun bidara.

Variabel kendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir dan perlu ditetapkan kualifikasinya, hasil yang didapatkan tidak menyebar dan dapat dilakukan peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311, kondisi laboratorium (antara lain: kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, tempat tumbuh tanaman, waktu panen, dan metode ekstraksi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun bidara adalah daun tanaman bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang segar berwarna hijau dan diambil secara acak, yang diperoleh dari daerah Singaraja, Bali

Kedua, serbuk daun bidara adalah serbuk yang diperoleh dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir dimaksudkan agar kotoran yang menempel dapat hilang, dikeringkan dengan oven 40 °C, lalu dibuat serbuk dan diayak dengan pengayak no 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun bidara adalah hasil ekstraksi serbuk daun bidara dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

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

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

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

Ketujuh, bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 yang diperoleh dari laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri adalah uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dan dilusi. Metode ini untuk mengukur luas daerah hambatan yaitu daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri. Kontrol negatif adalah pelarut Dimetilsulfoksida (DMSO) 5% dan kontrol positif antibiotik Siprofloksasin. Metode dilusi yaitu berupa seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi: 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,563%; 0,781%; 0,391%; 0,195%; 0,098% dengan kontrol positif suspensi bakteri dan kontrol negatif fraksi teraktif.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan penelitian adalah daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lam.) yang segar, bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311, etanol 70%, SSA (*Salmonella Shigela Agar*), *Brain Heart infusion* (BHI), HCl, aquadestilata, FeCl₃ 1%, larutan Dragendrof, asam sulfat pekat, asam asetat, DMSO 5%, *n*-heksana, serbuk Mg, SIM, KIA, LIA, Sitrat, cat kristal violet, larutan lugol, iodine, safranin, siprofloksasin, standar Mc Farland 0,5.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, ayakan, oven, *moisture balance*, botol maserasi, gelas ukur, kain flanel, *vacuum rotary evaporator*, *waterbath*, tabung reaksi steril, cawan petri steril, kapas lidi steril, jarum ose, autoclave, inkas, inkubator, lampu spiritus, corong kaca, kertas saring.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama dalam penelitian ini adalah melakukan identifikasi tumbuhan bidara di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi. Identifikasi ini bertujuan untuk mencocokkan ciri mikroskopis dan makroskopis, selain itu juga

berfungsi untuk mencocokkan ciri morfologi yang ada pada daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.).

2. Pembuatan serbuk daun bidara

Pembuatan serbuk daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) dengan cara dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Daun bidara yang sudah bersih dikeringkan dengan cara di oven dengan suhu 40°C. Daun bidara diserbuk dengan alat penyerbuk kemudian diayak dengan menggunakan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh serbuk yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen. Pembuatan serbuk bertujuan untuk memperbesar luas permukaan antara cairan penyari dengan serbuk.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun bidara

Penetapan susut pengeringan serbuk daun bidara menggunakan alat *moisture balance*. Serbuk ditimbang sebanyak 2 gram. Suhu *moisture balance* diatur yaitu sebesar 105°C dibiarkan hingga suhu naik, kemudian dimasukkan pada lempeng aluminium foil dengan posisi 0,00 sebanyak 2 gram serbuk daun bidara dalam keadaan auto. Ditunggu hingga konstan dengan ditandai bunyi, hasil dibaca dalam persen.

4. Pembuatan ekstrak etanol

Maserasi dapat dilakukan dengan cara memasukkan 1000 gram serbuk dengan derajat halus yang cocok. Dimasukkan dalam bejana lalu dituangi dengan 75 bagian cairan penyari. Ditunggu dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang dikocok, kemudian disaring dengan kain flanel dan dilanjutkan dengan kertas saring. Ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Keuntungan metode maserasi adalah alat yang digunakan sederhana murah, dan mudah dilakukan (BPOM RI 2007).

Persen rendemen diperoleh dari menimbang hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk daun bidara dan dikalikan 100%

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{berat serbuk daun bidara}} \times 100\%$$

5. Uji bebas etanol

Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya diuji bebas etanol, uji bebas etanol ini bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri. Uji bebas etanol ini dilakukan dengan tujuan esterifikasi. Ekstrak ditambah dengan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol jika tidak tercium bau ester yang khas dari etanol.

6. Fraksinasi

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

7. Pengujian kandungan kimia

7.1 Identifikasi alkaloid. Dimasukkan 0,5 gram ekstrak daun bidara dalam tabung reaksi, ditambah 1 ml HCl 2 N, dipanaskan kemudian ditambah reagen Dragendrof terbentuk endapan berwarna coklat, kuning hingga jingga (Harborne 1987).

7.2 Identifikasi flavonoid. Dimasukkan 0,1 gram ekstrak daun bidara, dilarutkan dalam 10 ml aquades dipanaskan hingga mendidih, diambil filtratnya. Kemudian filtrat ditambah serbuk Mg dan ditambahkan 1 ml HCl pekat, dan 1 ml amil alkohol. Campuran larutan dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi ditandai dengan adanya warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harborne 1987).

7.3 Identifikasi tanin dan polifenol. Dimasukkan 0,1 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi ditambah 10 ml air panas, dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh disebut larutan B. 5 ml larutan B

ditambah FeCl_3 1 %. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya warna biru tua atau hitam kehijauan (Harborne 1987). Polifenol dengan perlakuan sama seperti tanin hasil positif dengan adanya warna hijau, merah ungu, biru hitam (Harborne 1987).

7.4 Identifikasi saponin. Dimasukkan 0,5 gram serbuk, ekstrak etanol, dan fraksi air daun bidara masing-masing kedalam tabung reaksi, tambahkan air panas lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm (Harborne 1987).

8. Sterilisasi

Alat-alat gelas yang digunakan dicuci terlebih dahulu hingga bersih. Alat dan bahan dibungkus dengan koran. Masukkan dalam oven untuk mensterilkan dengan suhu 160°C selama 2 jam. Sterilisasi media *Brain Heart Infusion* (BHI), *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Kliger Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Simmons Citrate agar*, *Muller Hinton Agar* (MHA) menggunakan autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit.

9. Identifikasi bakteri uji

Bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311 dalam biakan murni diambil satu ose kemudian dimasukkan tabung yang berisi *Brain Heart Infusion* (BHI), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Bonang & Koeswardono 1982). Identifikasi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311, biakan *Salmonella typhi* diinokulasikan pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA), diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C .

Pewarnaan Gram negatif *Salmonella typhi* menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama) \pm 3 menit kemudian di bilas dengan air mengalir. Gram B (lugol iodine sebagai pengintensif warna) \pm 1 menit kemudian dibilas dengan air yang mengalir. Gram C (etanol : aseton = 1 : 1 sebagai peluntur warna) kemudian dibilas dengan air mengalir. Gram D (cat safranin sebagai penutup) \pm 1 menit. Bakteri dinyatakan Gram negatif apabila berwarna merah dibawah mikroskop (Yuswananda 2015).

10. Uji Biokimia

Media SIM (*Sulfida Indol Motility*) berwarna kuning. Uji pada media SIM dilakukan dengan cara tusukan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri. Uji positif pada *Salmonella typhi* ditandai dengan uji sulfida maka media berwarna hitam, uji indol tidak terbentuk cincin merah setelah ditambah reagen Ehrlich dan uji motilitas positif jika terjadi pertumbuhan positif pada seluruh media.

Media KIA (*Kliger Iron Agar*) berwarna merah. Uji pada media KIA dengan cara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Bertujuan untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa), ada tidaknya gas dan sulfida. Uji positif pada *Salmonella typhi* ditandai dengan bagian lereng akan berwarna merah, bagian dasar berwarna kuning, terbentuk warna hitam pada medium, dan adanya gas ditandai dengan pecahnya atau terangkatnya media keatas.

Media LIA (*Lysine Iron Agar*) berwarna ungu, uji pada media LIA dengan cara tusukan dan goresan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui diaminasi lisin dan sulfide. Uji positif pada *Salmonella typhi* ditandai dengan bagian lereng akan berwarna ungu dan medium berwarna hitam.

Media Sitrat berwarna ungu, uji pada media Sitrat dengan cara goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan Sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif pada *Salmonella typhi* ditandai dengan media berwarna biru.

11. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dalam biakan murni diambil 1 ose steril kemudian dimasukkan secara aseptis dalam tabung reaksi steril yang sudah berisi 5 ml BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian di inkubasi pada suhu 37°C Selama 24 jam, selanjutnya digunakan untuk identifikasi (Bonang & Koeswardono 1982).

12. Pengujian aktivitas antibakteri daun bidara secara difusi

Metode difusi dilakukan pada cawan petri steril yang berisi media MHA (*Muller Hinton Agar*) dan meletakkan cakram yang mengandung larutan uji. Pertama mengambil biakan bakteri dalam media BHI yang sudah dibandingkan dengan Mc Farland 0,5 dengan kapas lidi steril. Bakteri diinokulasikan pada medium MHA secara perataan, lalu didiamkan 10 menit agar suspensi biakan terdifusi ke media. Larutan stok ekstrak dan fraksi dibuat dengan masing-masing konsentrasi 50%, 25%, 12,5% digunakan pelarut DMSO 5%. Kertas cakram yang telah dijenuhkan kemudian diletakkan pada media MHA yang telah diolesi bakteri dan diletakkan sesuai dengan bagian masing-masing. Cakram 1 diisi ekstrak, cakram 2 diisi fraksi *n*-heksana, cakram 3 diisi fraksi etil asetat, cakram 4 diisi fraksi air. Cakram 5 diisi larutan DMSO 5% sebagai kontrol negatif. cakram 6 diisi disk antibiotik siprofloksasin sebagai kontrol positif. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri sekitar kertas cakram menandakan bahwa kandungan kimia memiliki daya hambat terhadap bakteri. Pengujian ini dilakukan dengan 3 kali replikasi.

13. Pengujian aktivitas antibakteri daun bidara secara dilusi

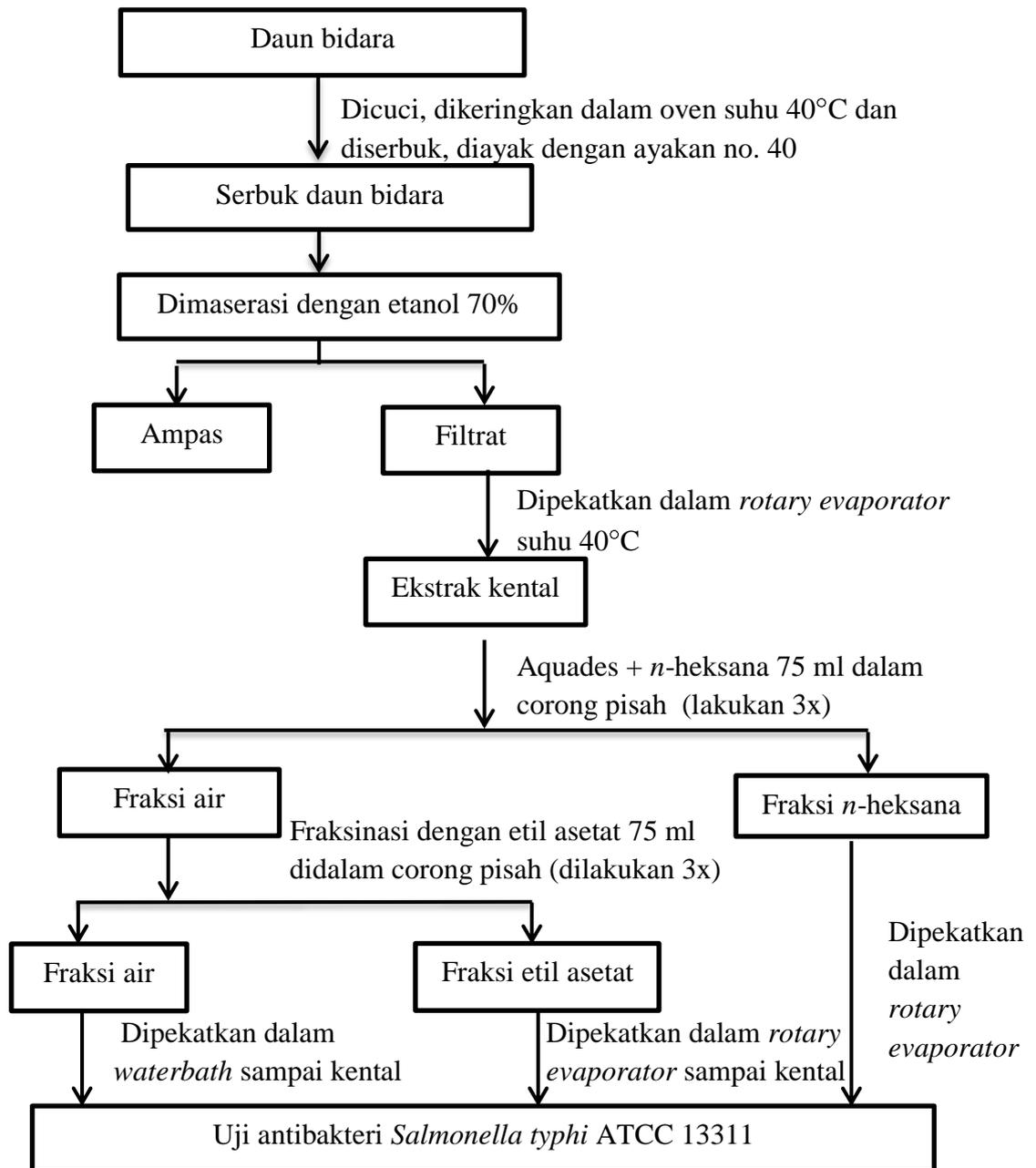
Hasil ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang diperoleh diuji secara mikrobiologi dengan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311. Pengujian daya antibakteri dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta dengan metode dilusi untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 12 tabung steril dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,13%; 1,56%; 0,79%; 0,40%; 0,20%; 0,10%; kontrol positif (+); kontrol negatif (-). Dimasukkan 0,5 media BHI dari tabung ke 2 sampai ke 11, secara aseptik. Ke dalam tabung 1 ditambahkan 1,0 mL larutan stok ekstrak yang akan diperiksa, kemudian tabung 2 dimasukkan 0,5 mL larutan stok yang akan diperiksa. Tabung 2 dipipet 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung 3 begitu seterusnya sampai tabung 11 kemudian dibuang 0,5 mL. Ditambahkan 0,5 mL biakan yang diperiksa suspensi biakan

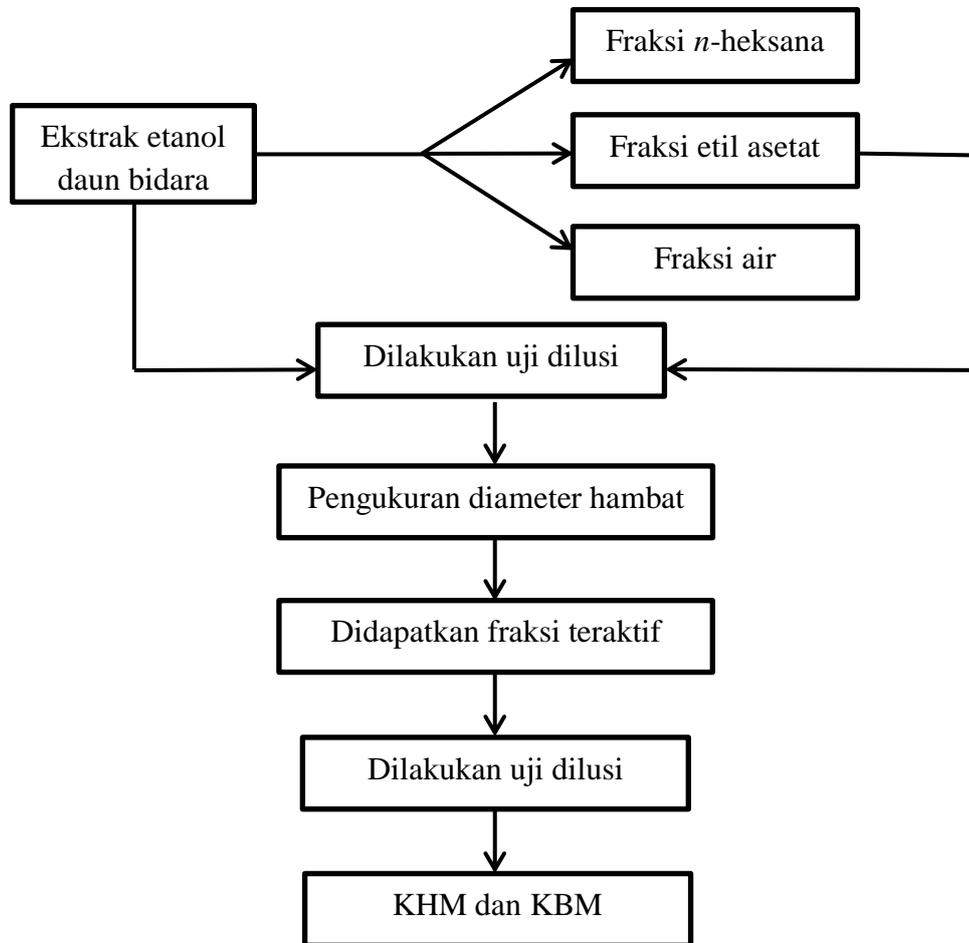
bakteri diencerkan 1:1000 dari tabung 2 sampai tabung 11. Tabung 12 sebagai kontrol positif. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan menggoreskan larutan dari sejumlah tabung yang hasilnya jernih pada medium SSA (*Salmonella Shigella agar*) kemudian diinkubasi 37°C selama 24 jam. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dari goresan bakteri yang sudah tidak terdapat pertumbuhan bakteri.

E. Analisis Hasil

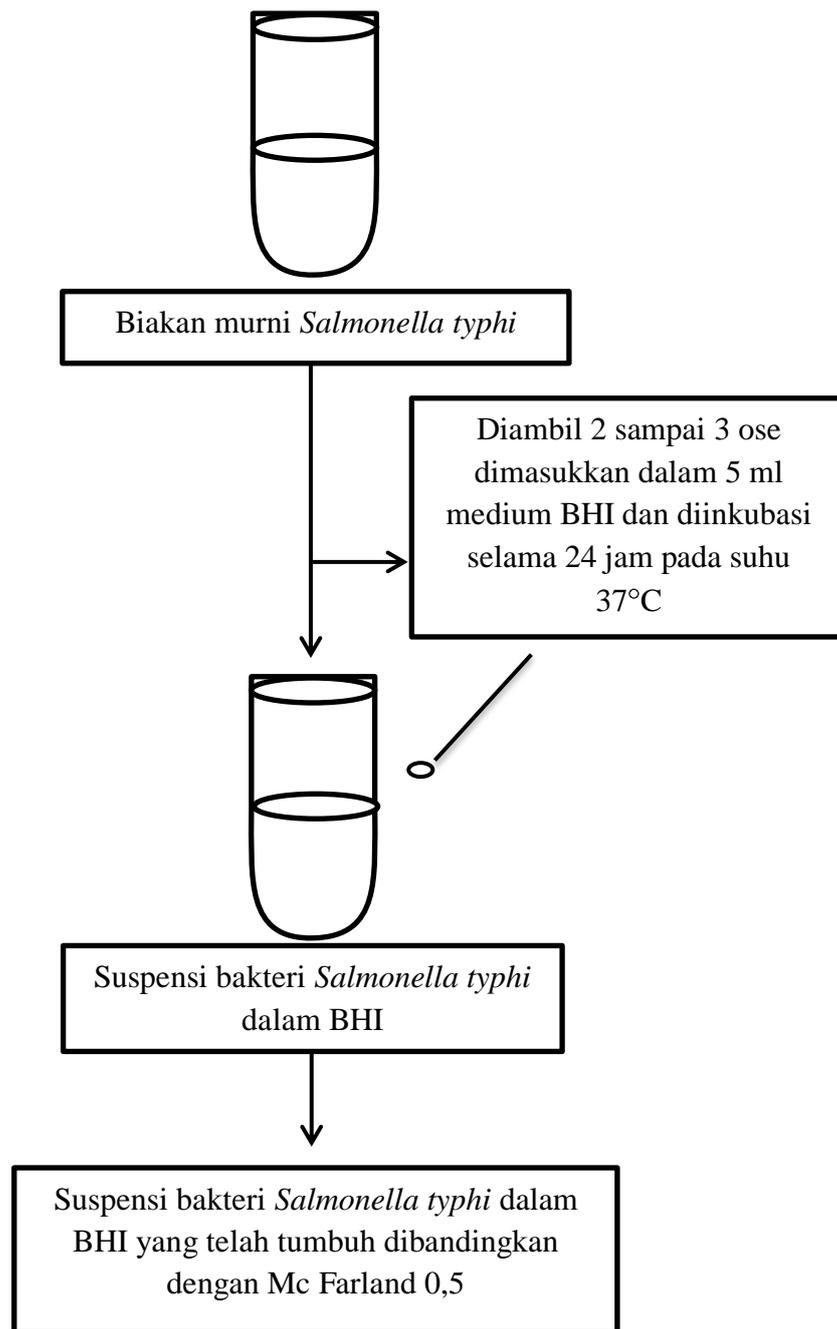
Data yang diperoleh dari pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lam.) terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 dengan menggunakan metode difusi selanjutnya dianalisis menggunakan *software* SPSS 17. Metode analisis yang digunakan dalam penelitian dilihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan *One-Sampel Kolmogorof-Smirnov*, sedangkan jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA).



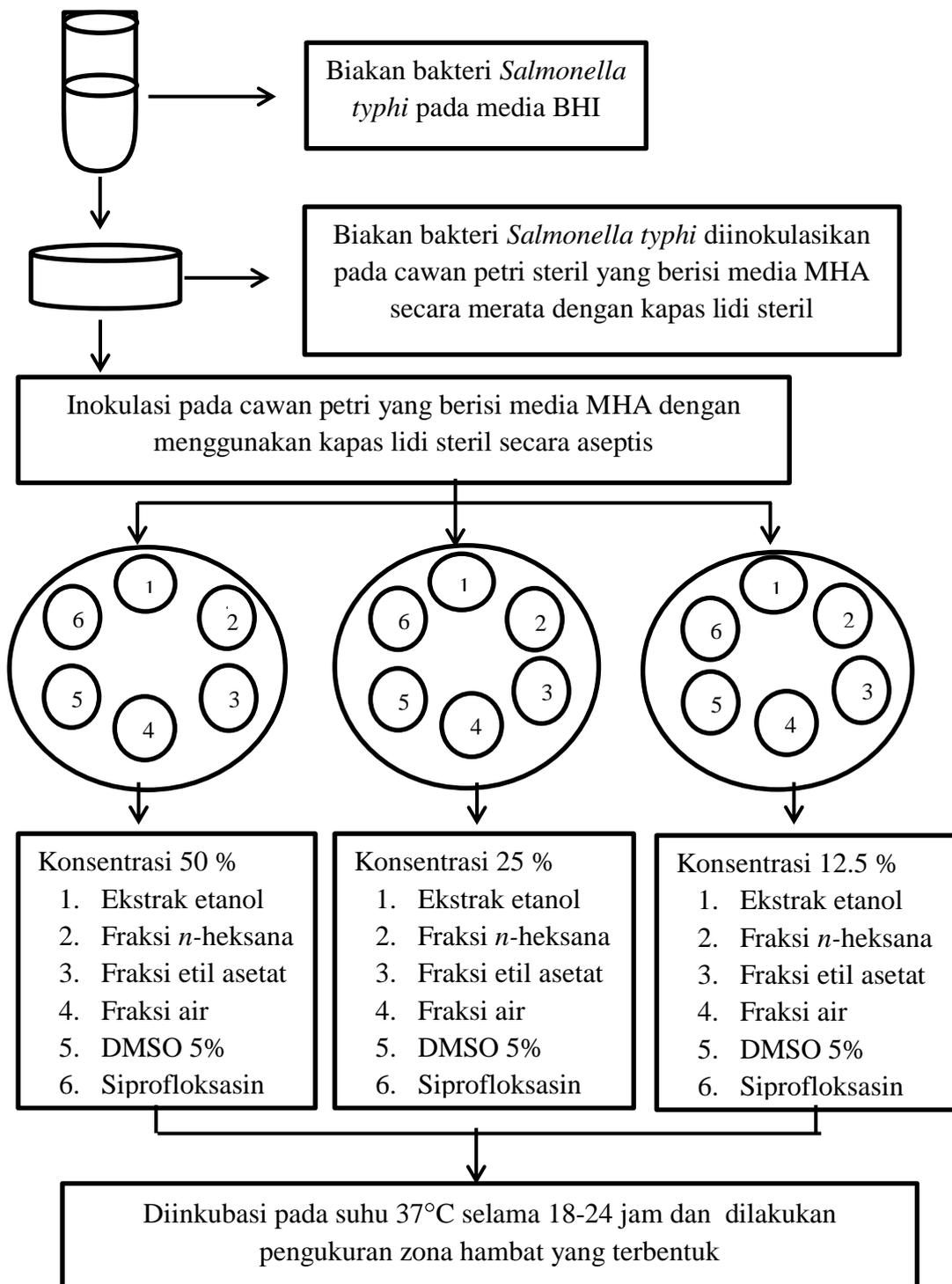
Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun bidara (*Zizyphus maurutiana* Lam.).



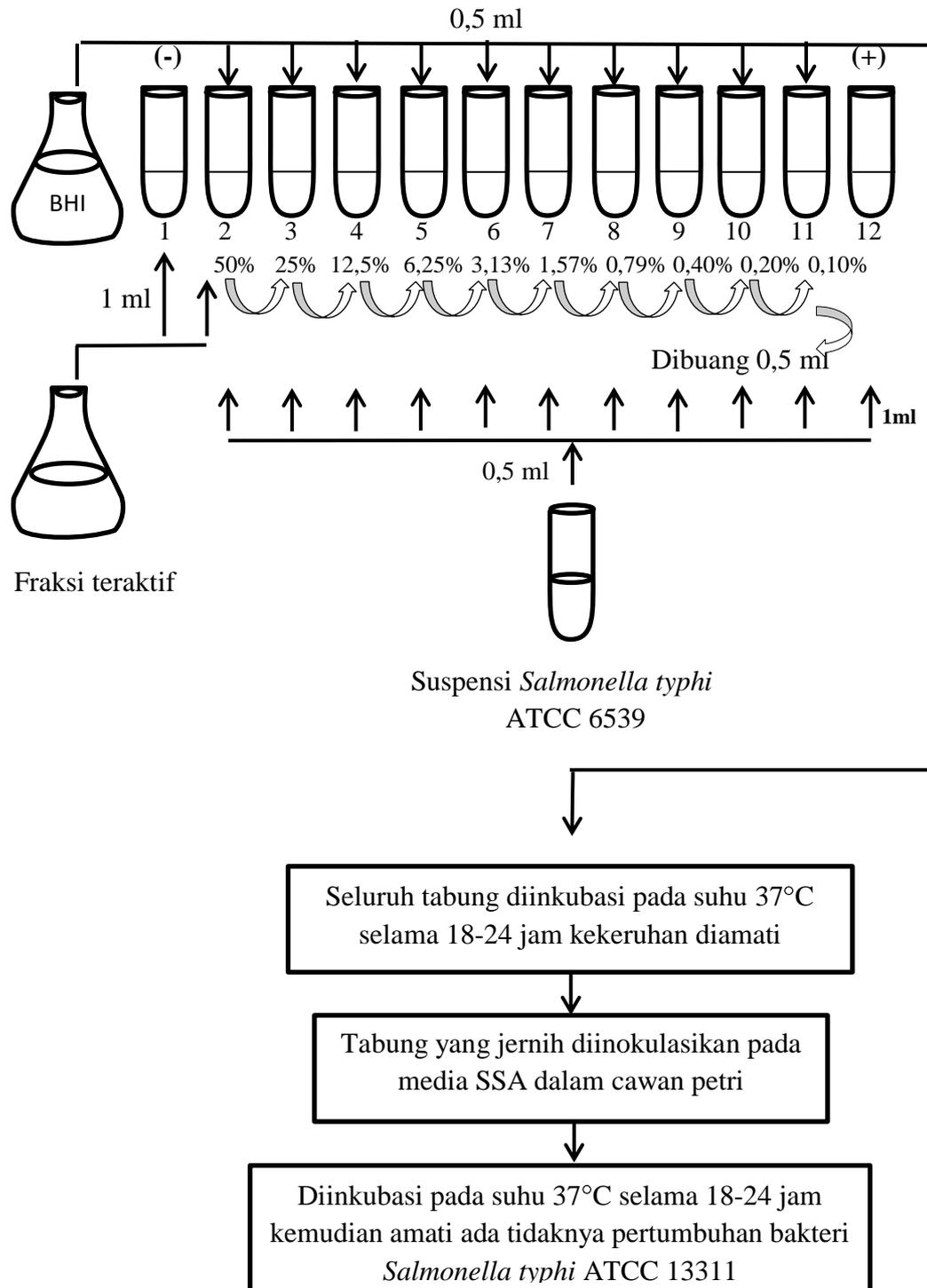
Gambar 3. Skema uji aktivitas antibakteri.



Gambar 4. Pembuatan suspensi bakteri.



Gambar 5. Skema pengujian antibakteri dengan metode difusi terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.



Gambar 6. Skema pengujian antibakteri dengan metode dilusi terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

BAB IV

HASIL PENETAPAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)

Determinasi tanaman bidara dilakukan di bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta. Berdasarkan hasil determinasi diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar tanaman bidara. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang tercantum dalam literatur, untuk menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan dan menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain.

Berdasarkan hasil determinasi dengan keterangan surat No : 214/DET/UPT-LAB/31/III/2018 dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.). Dengan hasil kunci determinasi sebagai berikut : 1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9b – 10b – 11b – 12b – 13b – 14a – 15a. golongan 8. 109b – 119b – 120b – 128b – 129b – 135b – 136b – 139b – 140b – 142b – 143b – 146a – 146b – 150b – 151a. familia 71. Rhamnaceae. 1. *Zizyphus*. 2. *Zizyphus mauritiana* Lamk. Surat keterangan hasil determinasi tanaman bidara dapat dilihat dalam lampiran 1.

2. Pembuatan serbuk daun bidara

Daun bidara yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir sampai terbebas dari kotoran. Daun yang sudah bersih diangin-anginkan kemudian ditimbang, setelah itu dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40° C. Proses pengeringan dapat memberikan keuntungan untuk mengurangi kadar air, untuk mencegah terjadinya reaksi enzimatik yang dapat menurunkan mutu serbuk, dan mempermudah untuk pembuatan serbuk.

Daun bidara yang sudah dikeringkan kemudian dibuat serbuk dengan mesin penyerbuk, kemudian diayak menggunakan ayakan no 40 mesh. Penyerbukan bertujuan untuk memperkecil partikel yang kontak dengan pelarut sehingga penyarinya dapat berlangsung efektif, mempermudah dalam pengemasan dan lebih praktis dalam penggunaan. Hasil presentase bobot kering terhadap bobot basah daun bidara dapat dilihat tabel 1.

Tabel 1. Hasil presentase bobot kering terhadap bobot basah daun bidara.

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
7000	2270	32,42

Berdasarkan Tabel 1 di atas dapat dilihat bahwa presentase rata-rata hasil pengeringan daun bidara didapat 32,42 %. Perhitungan presentase bobot kering terhadap bobot basah daun bidara dapat dilihat di lampiran 8.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun bidara

Penetapan susut pengeringan serbuk simplisia menggunakan alat *moisture balance*. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun bidara dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun bidara.

Bobot awal (g)	Bobot akhir (g)	Susut pengeringan (%)
2	1,89	5,4
2	1,87	5,2
2	1,88	5,3
Rata-rata		5,3

Tujuan penetapan susut pengeringan adalah untuk memberikan batas maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Hasil penetapan presentase susut pengeringan bobot simplisia didapatkan dengan jumlah rata-rata susut pengeringan 5,3%.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun bidara

Proses ekstraksi daun bidara menggunakan metode maserasi karena mudah dalam pengerjaannya, alat yang digunakan sederhana, dan untuk menghindari kerusakan senyawa aktif yang tidak tahan pemanasan dan biasanya digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung bahan aktif yang mudah larut dalam pelarut dan tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan (Voigt 1995).

Pelarut yang digunakan adalah pelarut etanol 70%, karena etanol merupakan pelarut universal, sehingga dapat menarik sebagian besar senyawa yang ada pada simplisia tersebut. Selain itu kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 70%, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, etanol dapat bercampur

dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Penggunaan etanol 70% sering dapat menghasilkan suatu bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengotor hanya dalam skala kecil turut dalam penyarian (Voigt 1995).

Wadah maserasi yang digunakan berbahan kaca gelap untuk menghindarkan dari sinar matahari langsung. Proses maserasi dilakukan dalam keadaan tertutup agar etanol tidak menguap pada suhu kamar. Serbuk daun bidara ditimbang 1000 gram ditambah etanol 70% 7500 ml kemudian dibiarkan selama 5 hari sambil di kocok. Hasil maserasi disaring dengan kain flanel dan dipekatkan dengan *vakum rotary evaporator*. Keuntungannya adalah dapat mencegah terurainya atau rusaknya senyawa aktif yang tidak stabil terhadap suhu tinggi. Hasil persen rendemen ekstrak etanol daun bidara dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil persen rendemen ekstrak etanol daun bidara.

Bobot serbuk (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
1000	192,35	19,235

Presentase rendemen ekstraksi daun bidara sebesar 19,235%. Ekstrak tersebut kemudian dilakukan fraksinasi dengan *n*-heksana, etil asetat, dan air. Perhitungan persen rendemen ekstrak etanol daun bidara dapat dilihat lampiran 9.

5. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan tes esterifikasi etanol ekstrak daun bidara. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun bidara dapat dilihat pada tabel 4.

Table 4. hasil uji bebas etanol ekstrak daun bidara

Pustaka	Hasil
Tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 2006).	Tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol

Hasil uji bebas etanol menunjukkan bahwa ekstrak daun bidara sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 70% yang ditunjukkan dengan tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol. Uji bebas etanol ini bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri.

6. Fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan kandungan golongan utama yang satu dengan yang lain. Pemisahan jumlah dan jenis menjadi fraksi yang berbeda, mula-mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, dimulai dengan pelarut non polar, kemudian disari dengan pelarut semi polar dan yang terakhir disari dengan pelarut polar.

Fraksinasi ekstrak etanol duan bidara dilakukan dengan menggunakan 3 pelarut yang berbeda berdasarkan perbedaan polaritasnya, pelarut non polar yang digunakan *n*-heksana, pelarut semi polar yang digunakan etil asetat dan pelarut polar yaitu air. Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang ekstrak 10 gram ekstrak etanol difraksinasi dengan pengulangan sebanyak 3 kali dan fraksinasi dilakukan sebanyak 15 kali, total penggunaan ekstrak untuk fraksinasi sebesar 150 gram. Hasil persen rendemen fraksinasi daun bidara dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil persen rendemen fraksinasi daun bidara

Ekstrak etanol (g)	Pelarut	Hasil fraksi (g)	Rendemen (%)
150	<i>n</i> -heksana	5,25	3,50
	Etil asetat	14,88	9,88
	Air	61,51	41,00

Tabel 5 menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana sebanyak 5,25 gram dengan rendemen 3,50 %, fraksi etil asetat sebanyak 14,88 gram dengan rendemen 9,88 %, dan fraksi air sebanyak 61,51 gram dengan rendemen 41,00 %. Hasil fraksinasi yang diperoleh tidak mencapai 150 gram, hal ini disebabkan karena proses penimbangan ekstrak hingga penimbangan fraksi mungkin ada yang menempel pada alat alat yang digunakan. Perhitungan rendemen fraksinasi daun bidara dapat dilihat pada lampiran 10.

Hasil fraksinasi menunjukkan adanya perbedaan persen rendemen dengan bobot fraksi air yang memiliki persen rendemen paling besar dimana diantara fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat. Perbedaan hasil fraksinasi dimungkinkan oleh adanya perbedaan kepolaran masing-masing golongan senyawa kimia. Fraksi air memiliki kepolaran paling tinggi diantara kedua fraksi. Fraksi air berperan

dalam menarik senyawa kimia yang bersifat polar. Fraksi *n*-heksana menarik senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar. Sedangkan fraksi etil asetat adalah pelarut yang semi polar, mudah terbakar dan mudah menguap (Harborne 1987).

7. Pengujian kandungan kimia

Uji kandungan kimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder yang tersusun di dalam ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air. Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan pada serbuk, ekstrak dan fraksi. Hasil pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun bidara dapat dilihat pada tabel 6. Foto pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun bidara dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 6. Hasil pengujian kandungan kimia serbuk, ekstrak, dan fraksi daun bidara

Kandungan kimia	Pustaka	Interprestasi hasil				
		Serbuk	Ekstrak	Fraksi		
				<i>n</i> -heksan	Etil asetat	Air
Alkaloid	endapan berwarna coklat, kuning, jingga pada reagen Dragendrof (Harborne 1987).	+	+	-	+	-
Flavonoid	warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Harborne 1987).	+	+	-	+	+
Tanin	warna biru tua, hitam kehijauan (Harborne 1987).	+	+	-	+	+
Polifenol	warna hijau, biru hitam (Harborne 1987).	+	+	-	+	+
Saponin	buih selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm (Harborne 1987).	+	+	-	-	+

Keterangan :

+ : mengandung golongan senyawa

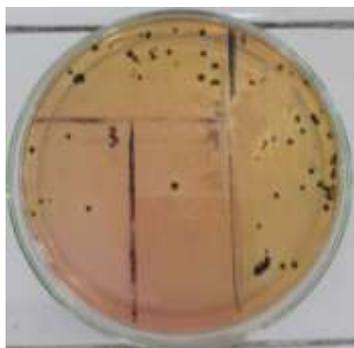
- : tidak mengandung golongan senyawa

Hasil identifikasi senyawa kimia yang dilakukan pada fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun bidara mengandung senyawa lebih sedikit dibandingkan dengan serbuk dan ekstrak. Hal ini dikarenakan prinsip dari fraksinasi yang memisahkan senyawa-senyawa berdasarkan polaritasnya. Fraksi *n*-heksana daun bidara mengandung senyawa non polar yaitu steroid. Fraksi etil

asetat menarik senyawa semi polar yaitu flavonoid, polifenol, alkaloid, dan tanin. Fraksi air mengandung senyawa polar yaitu alkaloid, tanin, polifenol, dan saponin

8. Identifikasi bakteri uji

Bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311 dalam biakan murni diambil 1 ose kemudian dimasukkan tabung yang berisi *Brain Heart Infusion* (BHI), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Identifikasi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311, biakan bakteri diinokulasikan secara goresan pada media *Salmonella shigela Agar* (SSA), diinkubasi suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil pengamatan menunjukkan koloni berwarna kuning dengan warna hitam dibagian tengah. Hasil identifikasi secara gores *Salmonella typhi* ATCC 13311 dapat dilihat pada gambar 7.

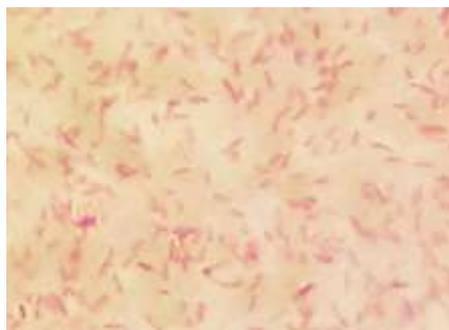


Gambar 7. Identifikasi secara makroskopis.

Pewarnaan gram bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan tersebut golongan Gram negatif. Gram negatif didapatkan apabila sel bakteri berwarna merah dan bentuk batang. Penetasan Kristal violet atau Gram A menyebabkan Kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram negatif dan positif. Penetasan mordant atau lugol iodine atau Gram B menyebabkan adanya ikatan Kristal violet dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Penetasan Gram C atau etanol : aseton menyebabkan terbentuknya pori-pori pada gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut etanol) sehingga kompleks kristal violet-iodine tidak menempel pada dinding sel yang menyebabkan sel Gram negatif menjadi bening.

Penetesan safranin atau Gram D akan mewarnai Gram negatif menjadi warna merah.

Prinsip dari metode ini adalah didasarkan pada perbedaan struktur pada dinding sel bakteri. Bakteri gram negatif berwarna merah karena memiliki dinding sel yang relatif tipis, membrane luar dilapisi oleh lipopolisakarida dan tidak dapat mempertahankan zat warna, sehingga pada saat penambahan Gram C warna dari Kristal violet luntur dan sewaktu diberi pewarnaan Gram D bakteri tampak berwarna merah (Jawetz *et al.* 2007). Hasil identifikasi secara pewarnaan Gram *Salmonella typhi* ATCC 13311 dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Identifikasi bakteri dengan pewarnaan.

9. Uji Biokimia

Hasil pengujian pada media SIM (*Sulfida Indol Motility*) bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfide, indol dan motilitas bakteri. Pengujian biakan murni bakteri diinokulasikan Pada permukaan media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil (+ - +). Hasil (+) artinya pada uji sulfida media berwarna hitam karena *Salmonella typhi* dapat mereduksi thiosulfate sehingga menghasilkan H₂S. Hasil (-) artinya pada uji indol tidak terbentuk cincin indol warna merah pada permukaan media setelah ditambah tiga tetes reagen Erlich A dan Erlich B karena bakteri tidak memfermentasi laktosa. Hasil (+) artinya pada uji motilitas terjadi pertumbuhan bakteri yang menyebar pada seluruh media, hal menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bakteri memiliki flagel.

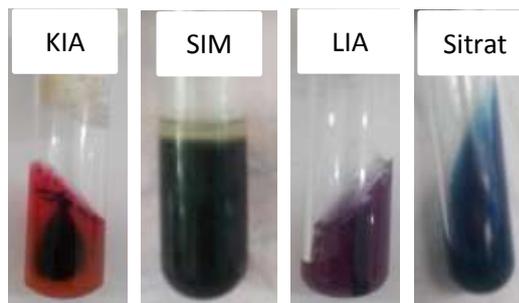
Hasil pengujian pada media KIA (*Kliger Iron Agar*) bertujuan untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa), ada tidaknya gas dan sulfide. Pengujian dengan biakan murni bakteri diinokulasi secara tusukan dan goresan kemudian

diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam menunjukkan hasil K/A S(+) G(+). Hasil (K) artinya pada bagian lereng akan berwarna merah, (A) artinya pada bagian dasar berwarna kuning karena tidak memfermentasi glukosa dan laktosa, hasil S(+) artinya terbentuk warna hitam pada medium karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media, hasil G(+) artinya terbentuknya gas yang ditandai dengan pecahnya atau tertangkapnya medium ke atas.

Hasil pengujian pada media LIA (*Lysine Iron Agar*) bertujuan menguji diaminasi lisin dan sulfide. Pengujian dengan biakan murni bakteri diinokulasi dengan cara tusukan dan goresan, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil K/K S(+). Hasil (K/K) artinya pada bagian lereng dan dasar media akan berwarna ungu hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) diseluruh media, hasil S(+) artinya sodium berwarna hitam karena terbentuknya H₂S.

Hasil pengujian pada media Sitrat bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan Sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian dengan biakan murni bakteri diinokulasi secara goresan, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil (+). Hasil (+) artinya media berwarna biru karena pada media Sitrat terdapat indikator BTB (*Brom Tymol Blue*) yang merupakan indikator pH jika mikroba mampu menggunakan sitrat menyebabkan suasana basa sehingga terjadi peningkatan pH dan perubahan warna media dari hijau menjadi biru.

Hasil identifikasi uji biokimia pada *Salmonella typhi* ATCC 13311 dapat dilihat pada tabel 7 dan gambar 9.



Gambar 9. Identifikasi biokimia

Tabel 7. Hasil identifikasi uji biokimia pada *S. typhi* ATCC 13311

Median uji	Pustaka	Hasil
KIA	K/ A S(+) G(+)	K/ A S(+) G(+)
SIM	+ - +	+ - +
LIA	K/ K S(+)	K/ K S(+)
Sitrat	+	+

Keterangan :

SIM	= <i>Sulfida Indol Motilitas</i>	A	= Alkali (kuning)
KIA	= <i>Kliger Iron Agar</i>	K	= Alkali (merah atau ungu)
LIA	= <i>Lysin Iron Agar</i>	G	= Gas (media terangkat)
+	= Reaksi positif	S	= Sulfida (hitam)
-	= Reaksi negatif		

10. Pengujian aktivitas antibakteri daun bidara secara difusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta menggunakan metode difusi. Metode difusi bertujuan untuk membandingkan senyawa yang paling efektif untuk bakteri uji dalam satu cawan petri. Pengujian antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 menggunakan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun bidara. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian ini adalah 50%; 25% dan 12,5%. Antibiotik siprofloksasin digunakan sebagai kontrol positif. DMSO 5% digunakan sebagai kontrol negatif.

Perhitungan dan pembuatan konsentrasi ekstrak etanol dapat dilihat pada lampiran 11. Kekekuan suspensi bakteri uji disesuaikan dengan standar Mc Farland 0,5. metode difusi dalam penelitian menggunakan metode disk cakram yang telah direndam dalam larutan uji. Masa inkubasi pengujian aktivitas

antibakteri pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil diameter hambat uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun bidara dapat dilihat pada tabel 8.

Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol 70% daun bidara memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Tabel 8. Hasil diameter hambat uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun bidara metode difusi

Sampel	Konsentrasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata±SD
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	50%	10	9	11	10,00±1,00
	25%	9	7	9	8,33±1.15
	12,5%	8	6	8	7,33± 1.15
Fraksi <i>n</i> -heksan	50%	9	8	9	8,67±0.57
	25%	8	8	7	7,67±0.57
	12,5%	6	7	6	6,33±0.57
Fraksi etil asetat	50%	14	13	15	14,00±1,00
	25%	11	12	13	12,00±1,00
	12,5%	10	11	12	11,00±1,00
Fraksi air	50%	10	9	8	9,00±1,00
	25%	9	8	7	8,00±1,00
	12,5%	7	8	6	7,00±1,00
Siprofloksasin	5%	30	27	25	27,33±2.51
DMSO	5%	0	0	0	0,00±0,00

Hasil uji aktivitas antibakteri pada tabel 8 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki daya hambat paling besar terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 dari pada fraksi *n*-heksana, air dan ekstrak daun bidara. Hasil rata-rata diameter daya hambat fraksi etil asetat konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% berturut-turut adalah 14,00 mm, 12,00 mm, dan 11,00 mm sedangkan siprofloksasin selaku kontrol positif memiliki rata-rata 27,33 mm. Kontrol negatif dalam pengujian aktivitas antibakteri menggunakan DMSO 5% dan berdasarkan hasil dari pengujian yang telah dilakukan bahwa DMSO 5% tidak memiliki daya hambat terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311. Foto uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun bidara terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 metode difusi dapat dilihat pada lampiran 6.

Analisis data hasil pengujian aktivitas antibakteri pada metode difusi menggunakan Analisis of Varian (ANOVA) *two way*. ANOVA *two way* digunakan untuk membandingkan sampel pada tiap konsentrasi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air. Hasil uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov* diperoleh $0,063 > 0,05$ maka H_0 diterima, data terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan dengan ANOVA. Pada *Mean Difference* terdapat tanda * pada tabel Tukey yang menunjukkan perbedaan diameter hambat antibakteri tersebut signifikan. Hasil analisis Tukey dapat dilihat pada lampiran 13.

Tabel *Homogeneous Subsets* bertujuan untuk mencari kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* terbagi dalam 7 subset, tabel ini bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbedasecara signifikan. Subset 1 terdapat kontrol negatif dan subset 2 sampai 6 terdapat sediaan uji dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Subset 6 hanya terdapat fraksi etil asetat konsentrasi 50%,25%, dan 12,5%, sehingga diketahui bahwa fraksi etil asetat 50% merupakan fraksti paling aktif. Diameter hambat konsentrasi 50% lebih besar dibandingkan konsentrasi 25% dan 12,5%, hal ini dikarenakan konsentrasi 25% dan 12,5 terlalu cair sehingga zat aktif sedikit berdifusi dalam media padat. Subset 7 terdapat kontrol positif, dari berbagai subset diketahui bahwa subset 1 sampai 7 mempunyai beda nyata dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Hal ini berbeda dengan sediaan uji yang masuk dalam satu subset tidak mempunyai beda secara signifikan dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Tabel *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada lampiran 13.

Tabel *Homogeneous Subsets* bertujuan untuk mencari kelompok yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* terbagi dalam 4 subset. Subset 1 terdapat kontrol negatif dan subset 2 dan 3 terdapat sediaan uji yang berbeda-beda. Subset 2 terdapat fraksi *n*-heksana, fraksi air, dan ekstrak. Subset 3 hanya terdapat fraksi etil asetat sehingga diketahui bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksti paling efektif karena mendekati subset 4 yang berisi siprofloksasin. Subset 4 terdapat kontrol positif,

dari berbagai subset dari 1 sampai 4 mempunyai beda nyata dalam penghambatan aktivitas antibakteri.

Fraksi etil asetat merupakan fraksi paling efektif karena memiliki daya hambat lebih besar terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 dibandingkan ekstrak, fraksi *n*-heksana dan air. Ekstrak etanol mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun bidara, akan tetapi senyawa-senyawa tersebut tidak mampu bekerja secara sinergis sehingga daya hambat yang terbentuk lebih kecil. Fraksi etil asetat memiliki daya hambat paling besar terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311, hal ini dikarenakan etil asetat mampu menarik senyawa yang paling efektif sebagai antibakteri dibandingkan dengan fraksi yang lain. Senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat adalah alkaloid, flavonoid, tanin, polifenol.

Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5% dimana pelarut ini merupakan pelarut yang digunakan dalam pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air. Penggunaan DMSO diatas 10% dapat menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri. Hasil dari pengujian DMSO 5% tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga daya hambat yang terbentuk benar-benar merupakan aktivitas dari masing-masing fraksi dan ekstrak etanol daun bidara.

Penelitian ini menggunakan antibakteri siprofloksasin sebagai pembanding pengujian daya antibakteri. Perbandingan fraksi etil asetat sebagai yang paling efektif dengan antibiotik siprofloksasin sebagai antibakteri menunjukkan hasil yang masih jauh dari yang diharapkan. Antibiotik siprofloksasin memiliki daya antibakteri yang lebih efektif jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat.

11. Pengujian aktivitas antibakteri daun bidara secara dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 dilakukan dengan metode dilusi. Seri konsentrasi yang digunakan dari fraksi etil asetat daun bidara yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,13%; 1,56%; 0,79%; 0,40%; 0,20%; 0,10%; kontrol (+); dan kontrol (-). Kontrol positif berupa bakteri uji dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI). Kontrol negatif berupa fraksi etil asetat. Perhitungan dan pembuatan konsentrasi fraksi teraktif (fraksi etil asetat) daun bidara metode dilusi dapat dilihat pada lampiran 12.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilihat dari batas terendah kejernihan tabung, pada tabung konsentrasi tertentu dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasikan secara gores pada cawan petri yang berisi media. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun bidara dapat dilihat pada tabel 9. Foto uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun bidara terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 metode dilusi dapat dilihat pada lampiran 7.

Tabel 9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun bidara metode dilusi

No	Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat		
		Replikasi		
		I	II	III
1	K (-)	-	-	-
2	50%	-	-	-
3	25%	-	-	-
4	12,5%	-	-	-
5	6,25%	+	+	+
6	3,13%	+	+	+
7	1,56%	+	+	+
8	0,79%	+	+	+
9	0,40%	+	+	+
10	0,20%	+	+	+
11	0,10%	+	+	+
12	K (+)	+	+	+

Keterangan :

+ : ada pertumbuhan bakteri

- : tidak ada pertumbuhan bakteri

Pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat, terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 dilanjutkan dengan metode dilusi untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Konsentrasi bunuh minimum yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan mengisolasi sediaan dari tabung uji pada media *Salmonella shigella agar* (SSA) pada cawan petri. Konsentrasi Bunuh Minimum ditentukan pada medium *Salmonella shigella agar* (SSA) dengan konsentrasi minimum yang tidak menunjukkan pertumbuhan *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Berdasarkan tabel 9 dapat dilihat bahwa uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 secara dilusi dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,13%; 1,56%; 0,79%; 0,40%; 0,20%; 0,10%; kontrol -; kontrol +. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilihat dari kejernihan pada tabung yang menunjukkan bahwa tabung pada konsentrasi tertentu dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil KHM daun bidara tidak dapat ditentukan karena tertutupi oleh kekeruhan dari bahan fraksi yang digunakan. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dapat dilihat dari pengujian fraksi terhadap bakteri uji pada tabung yang diinokulasikan pada media *Salmonella shigella agar* (SSA). Hasil Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan pada konsentrasi 12,5% karena tidak terdapat pertumbuhan bakteri.

Fraksi etil asetat adalah fraksi yang paling aktif. Hasil tersebut disebabkan oleh adanya kandungan senyawa semipolar di fraksi etil asetat yang lebih optimum dibandingkan senyawa di dalam fraksi *n*-heksana dan air. Daun bidara dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311, sehingga aktivitas antibakteri yang efektif dari fraksi etil asetat daun bidara adalah alkaloid, flavonoid, tanin.

Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri dengan mekanisme yaitu mengganggu komponen peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga pada lapisan dinding sel tidak lagi terbentuk secara utuh dan dapat menyebabkan kematian sel tersebut (Juliantina *et al.* 2008). Flavonoid memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut, sehingga dapat merusak membrane sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa yang ada di dalam sel (Ajizah 2004). Tanin memiliki mekanisme menciutkan atau mengkerutkan dinding sel atau membrane sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Ajizah 2004).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

Pertama, ekstrak etanol, fraksin-heksana, etil asetat, dan air dari daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Kedua, fraksi atil asetat dengan konsentrasi 50% dari ekstrak etanol daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) memiliki aktivitas antibakteri teraktif terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311 dengan diameter hambat 14 mm.

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yaitu 12,5% terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

B. Saran

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

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

DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah A. 2004. Sensitivitas *Salmonella Typhimurin* Terhadap Ekstrak Daun *Psidium guajava* L. *Bioscientiae*. 1(1)
- Alamsyah, Heru Kurniawan, Widowati I, Sabdono A. 2014. *Aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut Sargassum cinereum (J.G.Agardh)* dari perairan pulau panjang Jepara terhadap bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus epidermidi*. *Journal of Marine Research*. 3(2): 69-78.
- Amarantani C, Asmara W, Kushadiwijaya H, Sembring L. 2009. Seleksi bakteri *Salmonella typhi* dari kultur darah penderita demam tifoid. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta*. B13-B20.
- Ansel HC 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi ke 4. Faria I, penerjemah; Jakarta: Universitas Indonesia. Terjemahan dari : *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery*.
- Arias, Kathleen Meehan. 2003. *Investigasi dan Pengendalian Wabah di Fasilitas Pelayanan Kesehatan*. Jakarta: EGC
- Armanto R. 2009. *Memproduksi Minyak Atsiri Berkualitas*. Jakarta: Penerbar Swadaya.
- Beg MZ, Teotia UVS, Farooq S. 2016. In vitro antibacterial and anticancer activity of *Ziziphus mauritiana*. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 4 (5): 230-233.
- Bonang G, Koeswardono ES. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: PT Gramedia.
- [BPOM RI] Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2007. *Acuan Sediaan Herbal Volume Ketiga*. Jakarta: Direktorat OAI.
- Cita YP. 2011. Bakteri *Salmonella typhi* dan demam tifoid. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 6(1): 42-45
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia . 1979. *Materia Medika Indonesia*. Jilid III. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm. 13
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm. 1.4.7.10.

- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1987. *Analisis Obat Tradisional*. Jilid 1. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1989. *Material Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 468-489
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan*. Cet. 1. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Darmadi. 2008. *Infeksi Nosokomial: Problematika dan Pengendaliannya*. Jakarta: Salemba Medika.
- Ernawati dan Sari K. 2015. Kandungan Senyawa kimia dan aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah alpukat (*Persea americana* P.Mill) terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Kajian Vveteriner*. 3(2): : 203-211
- Ganiswara. 2005. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Jakarta: Gaya Baru.
- Goodman & Gilman. 2008. *Dasar Farmakologi Terapi*. Hardman JC, Limbird LE, editor; Musadad A, Soemardji AA, Nawawi A, Retnoningrum DS, Sukandar EY, Adnyana IK, Setia L, Iwo MI, Singgih M, Kusmardiyani M, Kusmardiyani S, Soebito S, Asyarie S, Suwendar, Syarif WR, tim alih bahasa, Jakarta: Buku Kedokteran ECG. Terjemahan dari: *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeuties, 10th ed.*
- Goyal M, Nagori BP, Sasmal D. 2012. Review on etnomecal uses, pharmacological activity and phytochemical constituents of *Ziziphus Mauritiana* (*Z. Jujuba* Lam., non Mill). *Spatula DD* 2: 107-116.
- Hadioetomo RS. 2005. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: EGC
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Kokasih P & Iwang S, penerjemah; Bandung: ITB
- Harminta. 2004. *Analisis Hayati*. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Heyne K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Terjemahan: Badan Litbang Kehutanan Jakarta. Jilid II dan III. Cetakan kesatu. Jakarta: Yayasan Saana Wana Jaya.
- Jawetz E, JL Melnick, EA Adelberg, GF Brooks, JS Butel, dan LN Ornston. 2005. *Mikrobiologi kedokteran*. Alih Bahasa Oleh Midihardi, E, Kuntaman, Warsito, E.B., Mertaniasih, N.M.,

- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2007. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Bonang G, penerjemah: Jakarta: EGC. Terjemahan dari *Medical Mikrobiologi*.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Aryandhito WN, Dian R, penerjemah. Ed ke – 25. Jakarta: EGC. Hal 232,362
- Juliantina F, Dewa ACM., Bunga N., Titis N., Endrawati T. B., 2008. Manfaat sirih merah (*piper crocatum*) sebagai agen anti bakteri terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 60:58-62
- Kusuma WH. 1993. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*. Jilid IV. Pustaka Kaetini, Jakarta.
- List PH, Schmidt PC. 2000. *Phytopharmacals Technology*. Alih bahasa: David Ellaby. Florida: CRC Press.
- Markham KM. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Kosasi Patmawinata, penerjemah. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Marliana E. 2007. Analisa senyawa metabolit sekunder dari batang *Spatholobus ferrugineus* (Zoll & Moritzi) Benth yang berfungsi sebagai antioksidan. *Jurnal Penelitian MIPA*. 1(1): 23-29
- Meinisasti R, Halim A, Zaini E. 2015. Karakterisasi Fisikokimia Sistem Biner Siprofloksasin HCl-PEG 4000. *Journal Sains Farmasi & Klinik*. 2(2): 30-35
- Mohamed AE, Elsharkawy ER, and Ed-dra A. 2016. Activity biological leaves metanolic extract bidara. *NAAS Journal*. 605-614
- Nelwan RHH. 2012. Tata laksana terkini demam tifoid. *Continuing Medical Education*. 39(4): 192
- Parmar P, Bhatt S, Dayani S, Jain A. 2012. Phytochemical Studies of The Secondary Metabolites of *Ziziphus mauritiana* Lam. Leaves. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 4(3), 153-155
- Peleczar MJ Jr, Chan ESC. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Volume ke 1. Hadioetomo RS, Imas T, Angka SL, penerjemah; Jakarta: UI. Pr. Terjemahan dari: *Elements of Mikrobiology*.
- Pratiwi, Sylvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Praeparandi. 2006. *Card System Analisa Kimia Farmasi Kualitatif*. Bandung: Seksi Diklat Stenth.

- Radji M. 2010. *Buku Ajaran Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta : EGC
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Kosasih Padwawinata, penerjemah. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Sandika I dan Suwandi JF. 2017. Sensitivitas *Salmonella thypi* Penyebaran Demam Tifoid Terhadap Beberapa Antibiotik. Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung. 6(1): 41-45
- Sharma GN, Amit G. 2013. *Ziziphus mauritiana Lam.* overview. *Indo American Journal of Pharma Ceutical Research*. 3(3): 4560-4566.
- Sivasankari M.P, and Sankaravadivoo A. 2015. Studi on antimicrobial actualy of *Ziziphus Mauritiana Lam.*. *Internasional Jurnal of Ayurveda and Pharma Research* 3(7): 52-55.
- Sriyanti DP, Wijayani A. 2008. *Tehnik Kultur Jaringan*. Cetakan ke-9. Yogyakarta: Penerbit Kanisus.
- Utami ER. 2011. Antibiotik, Resistensi, dan Rasionalitas Terapi. *EL-Hayah*. 1 (4): 191-198
- Upadhyay S, Upadhyay P, Ghosh AK, Singh Vijender. 2011. *Ziziphus mauritiana* : A review on phsrmacological potential of this underutilized plant. *Internasional Journal of Current Reseach and Review*. 04(03): 141-144.
- Voigt R 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi V. Noeron S, penerjemah. Yogyakarta: Gajah Mada University Press. Terjemahan dari *Pharmaceutical Technlogy*..
- Yuswananda NP. 2015. Identifikasi bakteri *Salmonella sp.* pada makanan jajanan di Masjid Fathullah Ciputat tahun 2015 [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri
- Wagner, H., Bladt, S., 1996, *Plant Drug Analysis:a THIN Layer Chromatography Atlas*, Second Ediition, New york, springer.
- Waluyo L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press.

L

A

M

P

9

R

A

N

Lampiran 1. Determinasi tanaman bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)



No : 214/DET/UPT-LAB/31/III/2018
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Widia Agustina
NIM : 20144300 A
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

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

Hasil determinasi berdasarkan : Steenis : FLORA

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

Deskripsi :

Habitus : Pohon, tinggi 5 – 15 m.
Akar : Sistem akar tunggang.
Batang : Percabangan monopodial, batang bengkok dan bertonjolan, ranting kerap kali menggantung
Daun : Tunggal, bertangkai, bulat telur oval, panjang 5 – 8 cm, lebar 2 – 6 cm, bertulang daun 3, bergerigi lemah, dari bawah putih atau coklat karat seperti vilt. Daun penumpu bentuk duri, hampir selalu salah satu dari keduanya gagal tumbuhnya.
Bunga : Majemuk payung tambahan, bertangkai pendek atau duduk, berambut seperti vilt, di ketiak. Daun pelindung bulat telur, berambut coklat karat. Bunga garis tengah lk 0,5 cm. Kelopak kuning hijau, separo jalan berlekuk 5, taju segi 3 bulat telur, dari dalam berflunas, dari luar bentuk vilt. Daun mahkota 5, bulat telur terbalik, bentuk tudung, putih. Tonjolan dasar bunga datar, berlekuk 10, mengelilingi bakal buah yang beruang 2. Cabang tangkai putik 2.
Buah : Buah batu berdaging, bentuk bola oval, panjang 1,5 – 2 cm, mula-mula kuning, kemudian merah tua, gundul.
Pustaka : Steenis C.G.G.J., Bloembergen S. Eyma P.J. (1978): *FLORA*, PT Pradnya Paramita. Jl. KebonSirih 46. Jakarta Pusat, 1978.



Surabaya, 31 Maret 2018
Tim Determinasi

Atmahan Wijosoendjojo, SU

Lampiran 2. Foto daun dan serbuk daun bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.).



Daun bidara



Serbuk daun bidara

Lampiran 3. Gambar alat yang digunakan



Moisture balance



Botol maserasi



Evaporator



Inkubator



Vortex



Penggilingan



Media BHI + bakteri
Salmonella typhi ATCC 13311

Standar Mc Farland
0,5%

Standar Mc Farland



Autoclave

Lampiran 4. Gambar ekstrak etanol, proses fraksinasi, hasil fraksinasi, dan larutan stok.



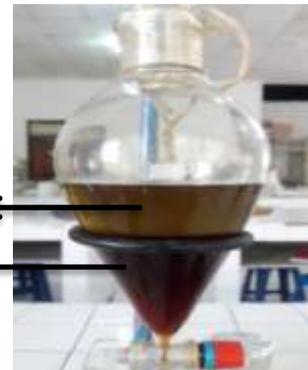
Ekstrak etanol



Fraksi *n*-heksana

Fraksi etil asetat

Fraksi air



Proses fraksinasi *n*-heksana

Proses fraksinasi etil asetat dan air



Hasil fraksi *n*-heksan



Hasil fraksi etil asetat



Hasil fraksi air

Lampiran 5. Gambar identifikasi kandungan senyawa kimia pada serbuk, ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dari daun bidara

Senyawa	Serbuk	Ekstrak	Fraksi		
			<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
Alkaloid	 + endapan coklat	 + endapan coklat	 - Tidak ada endapan coklat	 + endapan coklat	 - Tidak ada endapan coklat
Flavonoid	 + Warna jingga pada amil alkohol	 + Warna merah pada amil alkohol	 - Warna hijau pada amil alkohol	 + Warna merah pada amil alkohol	 + Warna jingga pada amil alkohol
Tanin	 + Hitam kehijauan	 + Hitam kehijauan	 - Fraksi berwarna jingga	 + Hitam kehijauan	 + Hitam kehijauan
Polifenol	 + Biru hitam	 + Biru hitam	 - Fraksi berwarna jingga	 + Biru hitam	 + Biru hitam
Saponin	 + Terdapat buih 2 cm	 + Terdapat buih 7 cm	 - Tidak ada buih	 - Tidak ada buih	 + Terdapat buih 5 cm

Keterangan :

+ : mengandung golongan senyawa

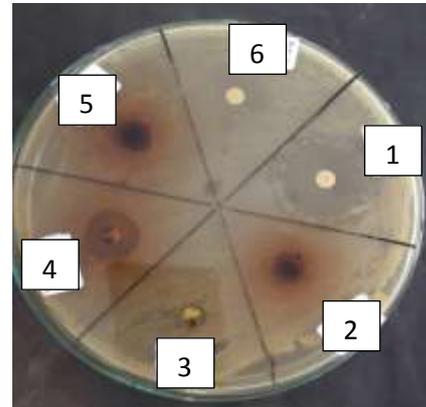
- : tidak mengandung golongan senyawa

Lampiran 6. Foto hasil difusi

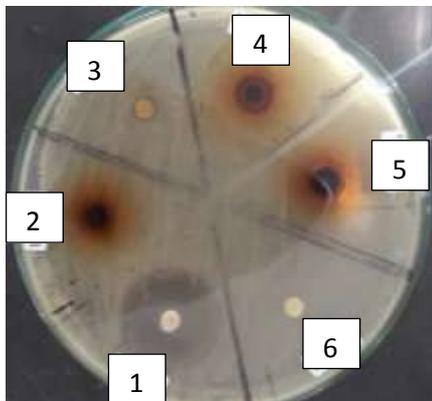
Konsentrasi 50%



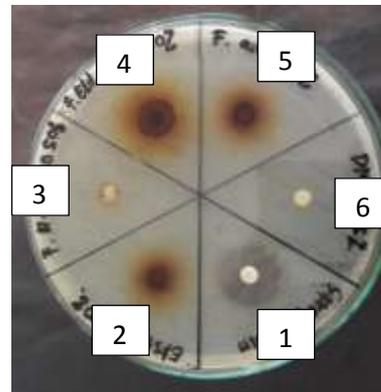
Larutan stok



Replikasi 1



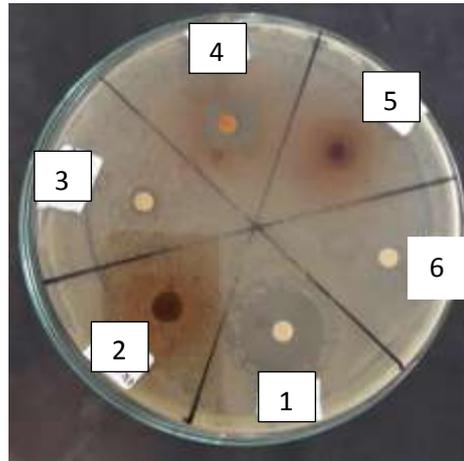
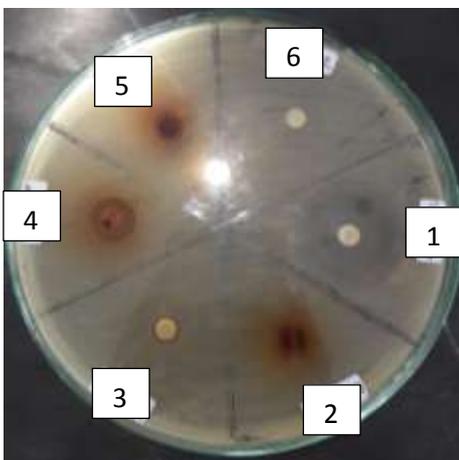
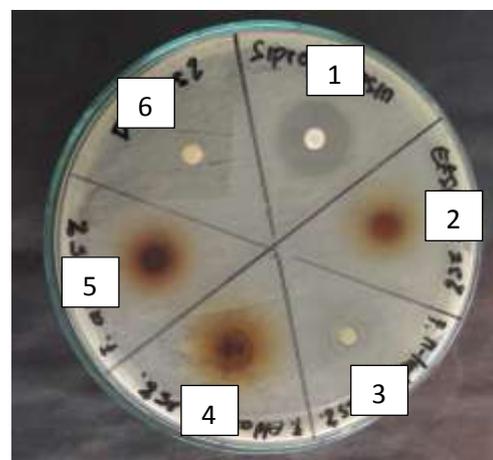
Replikasi 2



Replikasi 3

Keterangan :

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

Konsentrasi 25%**Larutan stok****Replikasi 1****Replikasi 2****Replikasi 3**

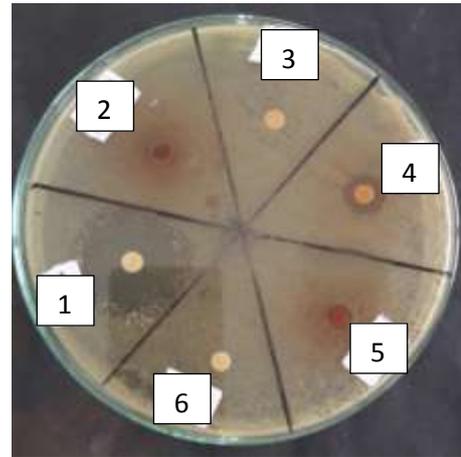
Keterangan :

1. Siprofloksasin
2. Ekstrak etanol 25%
3. Fraksi *n*-heksana 25%
4. Fraksi etil asetat 25%
5. Fraksi air 25%
6. DMSO5%

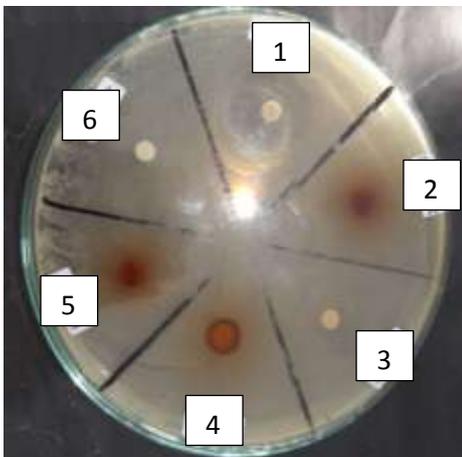
Konsentrasi 12,5%



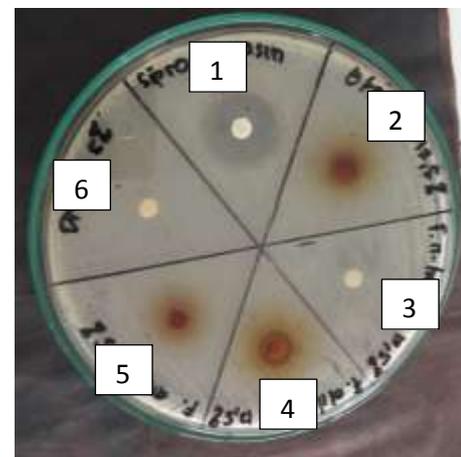
Larutan stok



Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3

Keterangan :

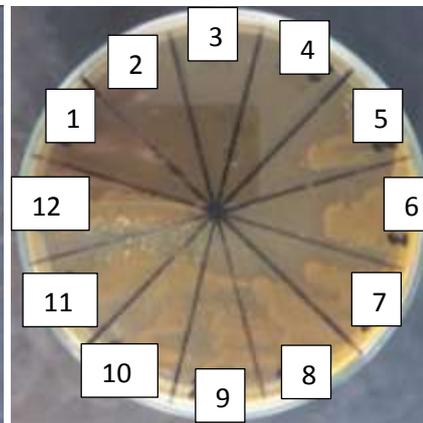
1. Siprofloksasin
2. Ekstrak etanol 12,5%
3. Fraksi *n*-heksana 12,5%
4. Fraksi etil asetat 12,5%
5. Fraksi air 12,5%
6. DMSO 5%

Lampiran 7. Foto hasil uji dilusi.

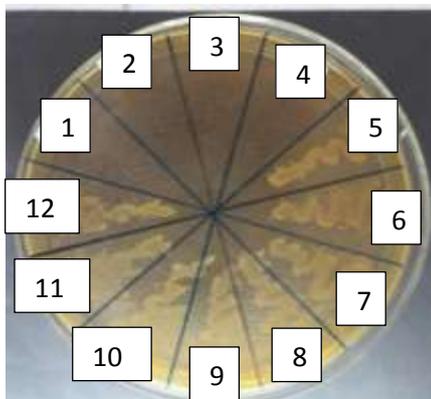
Larutan stok fraksi etil asetat metode dilusi



Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3

Keterangan :

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

Lampiran 8. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun bidara.

Bobot Basah (g)	Bobot kering (g)	Presentase %
7000	2270	32,42

$$\begin{aligned}\text{Presentase (\%)} &= \frac{\text{Bobot kering (Kg)}}{\text{Bobot basah (Kg)}} \times 100\% \\ &= \frac{2270}{7000} \times 100\% \\ &= 32,42 \%\end{aligned}$$

Lampiran 9. Perhitungan persen rendemen ekstrak

Bobot serbuk (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
1000	192,35	19,235

$$\begin{aligned}\text{Persen rendemen ekstrak etanol} &= \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat serbuk (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{192,35}{1000} \times 100\% \\ &= 19,235 \%\end{aligned}$$

Lampiran 10. Perhitungan persen rendemen fraksinasi daun bidara.

Ekstrak etanol (g)	Pelarut	Hasil fraksi (g)	Rendemen (%)
150	<i>n</i> -heksan	5,25	3,50
	Etil asetat	14,88	9,88
	Air	61,51	41,00

$$\text{Perhitungan rendemen fraksi} = \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\%$$

1. Fraksi *n*-heksan

$$\begin{aligned} \text{\% rendemen fraksi} &= \frac{5,25}{150} \times 100\% \\ &= 3,50 \% \end{aligned}$$

2. Fraksi etil asetat

$$\begin{aligned} \text{\% rendemen fraksi} &= \frac{14,88}{150} \times 100\% \\ &= 9,88 \% \end{aligned}$$

3. Fraksi air

$$\begin{aligned} \text{\% rendemen fraksi} &= \frac{61,51}{150} \times 100\% \\ &= 41,00\% \end{aligned}$$

Lampiran 11. Perhitungan dan pembuatan konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi daun bidara metode difusi

Larutan stok 50% : $50 \% \text{ b}_v = 50 \text{ gram}/100\text{ml}$

Konsentrasi 50% : $2 \text{ gram}/4\text{ml}$

Konsentrasi 25% : $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$
 $V_1 \cdot 50\% = 2 \text{ ml} \cdot 25\%$
 $V_1 = \frac{2 \text{ ml} \cdot 25\%}{50\%}$
 $V_1 = 1 \text{ ml}$

Konsentrasi 12,5% : $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$
 $V_1 \cdot 25\% = 2 \text{ ml} \cdot 12,5\%$
 $V_1 = \frac{2 \text{ ml} \cdot 12,5\%}{50\%}$
 $V_1 = 1 \text{ ml}$

Lampiran 12. Perhitungan pembuatan konsentrasi fraksi teraktif (fraksi etil asetat) daun bidara metode dilusi

Fraksi etil asetat 50% = 50 %^b v = 50 gram/100ml = 1 gram/2ml

Tabung 1 = kontrol (-) diisi fraksi ter aktif 1 ml konsentrasi 50%

Tabung 2 = 0,5 ml fraksi etil asetat knsentrasi 50%

Tabung 3 = pembuatan konsentrasi 25%

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

Tabung 4 = pembuatan konsentrasi 12,5%

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

Tabung 5 = pembuatan konsentrasi 6,25%

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

Tabung 6 = pembuatan konsentrasi 3,13 %

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

Tabung 7 = pembuatan konsentrasi 1,56 %

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 3,13\% &= 1 \text{ ml} \cdot 1,56\% \end{aligned}$$

$$V_1 = \frac{1 \text{ ml} \cdot 1,56\%}{3,13\%}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml}$$

Tabung 8 = pembuatan konsentrasi 0,79%

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 1,56\% = 1 \text{ ml} \cdot 0,79\%$$

$$V_1 = \frac{1 \text{ ml} \cdot 0,79\%}{1,56\%}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml}$$

Tabung 9 = pembuatan konsentrasi 0,40%

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 0,79\% = 1 \text{ ml} \cdot 0,40\%$$

$$V_1 = \frac{1 \text{ ml} \cdot 0,40\%}{0,79\%}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml}$$

Tabung 10 = pembuatan konsentrasi 0,20%

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 0,40\% = 1 \text{ ml} \cdot 0,20\%$$

$$V_1 = \frac{1 \text{ ml} \cdot 0,20\%}{0,40\%}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml}$$

Tabung 11 = pembuatan konsentrasi 0,10%

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 0,20\% = 1 \text{ ml} \cdot 0,10\%$$

$$V_1 = \frac{1 \text{ ml} \cdot 0,10\%}{0,20\%}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml}$$

Tabung 12 = kontrol (+) diisi suspensi bakteri 1 ml

Keterangan : tabung 2 sampai 11 ditambah suspensi bakteri 0,5 ml

Tabung 2 sampai 11 diberi BHI 0,5 ml

Lampiran 13. Hasil analisis Tukey dan tabel *Homogeneous Subsets*

Uji Kolmogorov-Smirnov

Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANOVA

Kriteria uji :

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

Hasil

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Daya hambat	42	9.7619	5.90498	.00	30.00

		dayahambat
N		42
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9.7619
	Std. Deviation	5.90498
Most Extreme Differences	Absolute	.203
	Positive	.203
	Negative	-.191
Kolmogorov-Smirnov Z		1.313
Asymp. Sig. (2-tailed)		.063

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

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

Uji Leyene

Tujuan : untuk mengetahui homogenitas

Kriteria uji :

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

Hasil :

Test of Homogeneity of Variances

Diameter hambatan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.433	13	28	.206

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

Uji *Two Way* ANOVA

Uji Post Hoc

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

Kriteria uji :

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

Hasil :

Multiple Comparisons

Diameter hambatan

Tukey HSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak	fraksi n-heksana	1.0000	.36289	.089	-.0918	2.0918
	fraksi etilasetat	-3.7778*	.36289	.000	-4.8696	-2.6860
	fraksi air	.5556	.36289	.647	-.5362	1.6473
	Siprofloksasin	-18.7744*	.36289	.000	-19.8662	-17.6827
	DMSO 5%	8.5556*	.36289	.000	7.4638	9.6473
fraksi n-heksana	ekstrak	-1.0000	.36289	.089	-2.0918	.0918
	fraksi etilasetat	-4.7778*	.36289	.000	-5.8696	-3.6860
	fraksi air	-.4444	.36289	.822	-1.5362	.6473

	Siprofloksasin	-19.7744 ⁺	.36289	.000	-20.8662	-18.6827
	DMSO 5%	7.5556 ⁺	.36289	.000	6.4638	8.6473
fraksi etil asetat	ekstrak	3.7778 ⁺	.36289	.000	2.6860	4.8696
	fraksi n- heksana	4.7778 ⁺	.36289	.000	3.6860	5.8696
	fraksi air	4.3333 ⁺	.36289	.000	3.2416	5.4251
	Siprofloksasin	-14.9967 ⁺	.36289	.000	-16.0884	-13.9049
	DMSO 5%	12.3333 ⁺	.36289	.000	11.2416	13.4251
fraksi air	ekstrak	-.5556	.36289	.647	-1.6473	.5362
	fraksi n- heksana	.4444	.36289	.822	-.6473	1.5362
	fraksi etil asetat	-4.3333 ⁺	.36289	.000	-5.4251	-3.2416
	Siprofloksasin	-19.3300 ⁺	.36289	.000	-20.4218	-18.2382
	DMSO 5%	8.0000 ⁺	.36289	.000	6.9082	9.0918
Siprofloksasin	ekstrak	18.7744 ⁺	.36289	.000	17.6827	19.8662
	fraksi n- heksana	19.7744 ⁺	.36289	.000	18.6827	20.8662
	fraksi etil asetat	14.9967 ⁺	.36289	.000	13.9049	16.0884
	fraksi air	19.3300 ⁺	.36289	.000	18.2382	20.4218
	DMSO 5%	27.3300 ⁺	.36289	.000	26.2382	28.4218
DMSO 5%	ekstrak	-8.5556 ⁺	.36289	.000	-9.6473	-7.4638
	fraksi n- heksana	-7.5556 ⁺	.36289	.000	-8.6473	-6.4638
	fraksi etil asetat	-12.3333 ⁺	.36289	.000	-13.4251	-11.2416
	fraksi air	-8.0000 ⁺	.36289	.000	-9.0918	-6.9082
	Siprofloksasin	-27.3300 ⁺	.36289	.000	-28.4218	-26.2382

Homogeneous Subsets

Daya hambat

Tukey HSD^{a,b}

sampel	N	Subset			
		1	2	3	4
DMSO 5%	9	.0000			
fraksi n-heksana	9		7.5556		
fraksi air	9		8.0000		
ekstrak	9		8.5556		
fraksi etil asetat	9			12.3333	
Siprofloksasin	9				27.3300
Sig.		1.000	.089	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .593.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = .05.

Lampiran 14. formulasi dan pembuatan media

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

Beef extract	5	gram
Enzymatic digest of casein	2,5	gram
Enzymatic digest of animal tissue	2,5	gram
Lactose	10	gram
Bile salts	8,5	gram
Sodium citrat	8,5	gram
Sodium thiosulfat	8,5	gram
Ferric citrate	1	gram
Brilian green	0,0003	gram
Neutral red.....	0,025	gram
Agar	13	gram

Ditimbang 60 gram bahan media SSA dimasukkan dalam beaker glass ditambahkan aquades sampai 1000 mL, panaskan hingga mendidih. Dimasukkan kedalam cawan petri steril secara aseptis. Media SSA tidak diautoklave. pH $7,0 \pm 0,2$ pada suhu 25°C .

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

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

Ditimbang 38 gram media MHA, dimasukkan pada beaker glass ditambahkan aquadest sampai 1000 mL. Dipanaskan sampai mendidih.. Disterilkan dengan autoklave pada suhu 121°C selama 15 menit. pH media *Mueller Hinton Agar* (MHA) adalah $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C .

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

Brain infusion	7,5	gram
Beef heart infusion	10	gram
Gelatin pepton	10	gram
Dextrose	2	gram

Sodium chloride 5 gram

Disodium phosphate 2,5 gram

Ditimbang 37 gram bahan BHI, ditambahkan aquades sampai 1000 mL, dipanaskan sampai larut, disterilkan dengan autoklave pada suhu 121° C selama 15 menit, pH media BHI $7,4 \pm 0,2$ pada suhu 25°C.

4. Formulasi dan pembuatan SIM (*Sulfide Indol Motility*)

Casein digest peptone 20 gram

Peptic digest of animal tissue 6,1 gram

Ferrous ammonium citrate 0,2 gram

Sodium thiosulfate 0,2 gram

Agar 3,5 gram

Ditimbang 30 gram media SIM, dimasukkan dalam beaker glass. Ditambahkan aquades sampai 1000 mL, dipanaskan hingga mendidih. Disterilkan dalam autoklave pada suhu 121°C selama 15 menit. pH media SIM yaitu $7,3 \pm 0,2$ pada suhu 24°C.

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

Casein peptone 10 gram

Lactose 10 gram

Meat peptone 10 gram

Sodium chloride 5 gram

Dextrose 1 gram

Sodium thiosulfate 0,3 gram

Ferric ammonium citrate 0,2 gram

Phenol red 0,25gram

Agar 12,5 gram

Ditimbang 55 gram media KIA. Dimasukkan dalam beaker glass. Ditambahkan quades sampai 1000 mL, dipanaskan dengan stering hotplate sampai mendidih. Kemudian masukkan dalam tabung reaksi 10 mL, ditutup dengan kapas. Setiap 10 tabung di ikat dengan karet dan ditutup kertas. Di sterilkan dengan autoklave pada suhu 121° C selama 15menit. pH media KIA yaitu $7,4 \pm 0,2$ pada suhu 25°C.

6. Formulasi pembuatan LIA (*Lysine Iron Agar*)

L-Lysine	10	gram
Gelatin peptone.....	5	gram
Yeast extract.....	3	gram
dextrose	1	gram
ferric ammonium citrate	0,50	gram
sodium thiosulfate	0,04	gram
Bromocresol purple	0,02	gram
Agar	13,5	gram

Ditimbang 33 gram media LIA, ditambahkan aquadest sampai 1000 mL, dipanaskan sampai mendidih. Dimasukkan dalam tabung lalu sterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 12 menit dan biarkan dalam posisi miring. Simpan medium pada suhu 8-15°C. pH media LIA yaitu $6,7 \pm 0,2$ pada suhu 25°C.

7. Formulasi dan pembuatan *Simmons Citrate agar*

Magnesium sulphate.....	0,2	gram
Ammonium dyhydrogen phosphate	0,2	gram
Sodium ammonium phosphate	0,8	gram
Sodium citrate, tribasic.....	2	gram
`` Sodium chloride	5	gram
` Bromothymol blue.....	0,08	gram
Agar	15	gram

Timbang 23 gram bahan Simmons citrate agar, dimasukkan dalam beaker glass, ditambahkan aquades sampai 1000 mL, dipanaskan sampai mendidih, disterilkan dengan autoklave pada suhu 121° C selama 15 menit. pH media yaitu $7,0 \pm 0,2$ pada suhu 25°C.