UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI, FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR, EKSTRAK ETANOL BIJI PINANG (*Areca cathechu* L) TERHADAP BAKTERI *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031

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

Oleh :

Yusafian Bagus Kris Damas
20144132A

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017

PENGESAHAN SKRIPSI
berjudul

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL BIJI PINANG (*Areca catechu* L.) TERHADAP BAKTERI *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

Oleh :

Yusafian Bagus Kris Damas
20144132A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 2 Juli 2018

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Dekan,

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

Pembimbing,

Endang Sri Rejeki, M.Si., Apt.

Pembimbing Pendamping,

Dra. Nony Puspawati, M.Si

Penguji:
1. Drs. Edy Prasetya, M.Si. 1. .....
2. Fransiska Leviana, M.sc., Apt 2. .....
3. Dwi Ningsih, S.Si.,M.Farm.,Apt 3. .....
4. Endang Sri Rejeki, S.Si.,M.Si., Apt. 4. .....

PERNYATAAN

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

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

Surakarta, Juni 2018

Yusafian Bagus Kris Damas

HALAMAN PERSEMBAHAN

Tak ada yang lebih baik bagi manusia dari pada makan dan minum dan bersenang-senang dalam jerih payahnya. Aku menyadari bahwa inipun dari tangan Allah. --- Pengkhotbah 2:24

Jangan seorangpun menganggap engkau rendah karena engkau muda. Jadilah teladan bagi orang-orang percaya, dalam perkataanmu, dalam tingkah lakumu, dalam kasihmu, dalam kesetiaanmu dan dalama kesuvianmu. --- 1 Timotius 4:12

Diberkatilah orang yang mengandalkan TUHAN, yang menaruh harapannya pada TUHAN! --- Yeremia 17:7

Skripsi ini kupersembahkan kepada:

Tuhan Yesus Kristus.
Ayah , Ibu , adik tercinta yang telah mendukung dan mendoakanku.
Sahabat - sahabatku tercinta.
Teman – teman seperjuangan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
Almamater, Bangsa dan Negara.

KATA PENGANTAR

Puji Tuhan, segala puji dan syukur kepada Tuhan yang telah memberi berkat dan kebijaksanaan, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul "**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI, FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR, EKSTRAK ETANOL BIJI PINANG (*Areca cathechu* L) TERHADAP BAKTERI *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031".** Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

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

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Endang Sri Rejeki, M.Si., Apt. selaku Pembimbing Utama dan Dra. Nony Puspawati M.Si. selaku Pembimbing Pendamping yang telah berkenan mengorbankan waktunya guna membimbing, memberi nasehat, dan mengarahkan penulis pada saat penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Dosen penguji yang telah memberikan masukan demi kesempurnaan dalam skripsi ini.
5. Seluruh Dosen, Asisten Dosen, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi.
6. Tuhan Yesus Kristus yang telah memberi cinta, kasih sayang, kekuatan, hikmat serta kemampuan dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Ayah, Ibu, adik serta seluruh keluarga besarku yang telah memberikan cinta, kasih sayang, doa, dukungan dan pengorbanan, serta semangat untuk segera menyelesaikan skripsi ini.
8. Patner skripsi (Gembul Eliz) atas bantuannya dan kerjasamanya serta semangatnya dalam menyelesaikan skripsis ini.
9. Sahabat dan teman-teman pejuang skripsi (Wandari dan Desi) atas bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan penelitian skripsi ini.

10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

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

Surakarta, Juni 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
PENGESAHAN ii
PERNYATAAN iii
PERSEMBAHAN iv
KATA PENGANTAR v
DAFTAR ISI vii
DAFTAR GAMBAR xii
DAFTAR TABEL xiii
DAFTAR LAMPIRAN xiv
INTISARI xv
BAB I PENDAHULUAN 1
A. Latar Belakang 1
B. Perumusan Masalah 4
C. Tujuan Penelitian 4
D. Manfaat Penelitian 4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA 6
A. Tanaman Pinang 6
1. Sistematika tanaman pinang. 6
2. Nama lain. 6
3. Morfologi tanaman. 7
4. Kandungan kimia. 7
4.1 Alkaloid. 7
4.2 Flavonoid. 7
4.3 Tanin. 8
4.4 Saponin. 8
5. Perkembangan penelitian biji pinang 9
B. Simplisia 9
1. Pengertian simplisia. 9
2. Pengumpulan simplisia. 10
3. Pemilihan simplisa 10
4. Pengeringan 10
5. Pembuatan serbuk 10
C. Ekstraksi 10

1. Pengertian ekstraksi. 11
2. Metode ekstraksi. 11
2.1 Maserasi. 11
2.2 Perkolasi. 11
2.3 Refluks. 11
2.4 Soxhletasi. 11
2.5 Infusa. 11
2.6 Dekok. 12
2.7 Destilasi. 12
3. Fraksinasi. 12
4. Pelarut. 12
4.1 Etanol 96%. 12
4.2 *n*-heksana 13
4.3 Etil asetat. 13
4.4 Air. 13
D. *Klebsiella pneunomiae* 13
1. Sistematika bakteri. 13
2. Morfologi dan sifat bakteri. 14
3. Patogenesis. 14
4. Toksin. 14
5. Pengobatan. 14
E. Antibakteri. 14
1. Definisi. 15
2. Mekanisme kerja antibakteri. 15
2.1 Penghambat metabolisme sel bakteri. 15
2.2 Penghambat sintesis dinding sel. 15
2.3 Perubahan permeabilitas sel bakteri. 16
2.4 Penghambatan sintesis protein sel bakteri. 16
2.5 Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri. 16
F. Uji Aktivitas Antibakteri. 16
1. Metode difusi. 16
2. Metode dilusi. 17

G. Media..... 17
1. Pengertian media..... 17
2. Macam-macam bentuk media..... 18
2.1 Media padat..... 18
2.2 Media cair..... 18
2.3 Media semi cair atau semi padat..... 18
3. Jenis jenis pertumbuhan bakteri..... 18
3.1 Media sintetik..... 18
3.2 Media komplek..... 18
3.3 Media biakan khusus..... 18
3.4 Media selektif dan diferensial..... 19
3.5 Media biakan khusus..... 19
3.6 Media pengayakan..... 19
H. Sterilisasi..... 19
1. Cara sterilisasi..... 20
1.1 Sterilisasi uap..... 20
1.2 Sterilisasi panas kering..... 20
1.3 Sterilisasi gas..... 20
1.4 Sterilisasi dengan radiasi ion..... 20
1.5 Sterilisasi dengan penyaringan..... 21
I. Ciprofloksasin..... 21
J. Kromatografi Lapis Tipis..... 22
K. Landasan Teori..... 22
L. Hipotesis..... 24
BAB III METODE PENELITIAN..... 25
A. Populasi dan Sampel..... 25
B. Variabel Penelitian..... 25
1. Identifikasi variabel utama..... 25
2. Klasifikasi variabel utama..... 25
3. Definisi operasional variabel utama..... 26
C. Alat dan Bahan..... 27
1. Bahan..... 27

2. Alat..... 27
D. Jalannya Penelitian..... 27
1. Determinasi tanaman. 27
2. Pengeringan bahan dan penyerbukan biji pinang. 28
3. Penetapan kadar air. 28
4. Pembuatan ekstrak secara maserasi. 28
5. Uji bebas etanol. 29
6. Penetapan % rendemen. 29
7. Pengujian kandungan ekstrak biji pinang. 29
7.1 Identifikasi alkaloid. 29
7.2 Identifikasi flavonoid. 29
7.3 Identifikasi tanin. 29
7.4 Identifikasi saponin. 29
8. Fraksinasi. 30
9. Sterilisasi. 30
10.Identifikasi bakteri uji. 30
10.1. Identifikasi bakteri berdasarkan koloni. 30
10.2. Identifikasi bakteri secara pewarnaan Gram. 31
10.3. Identifikasi bakteri uji secara biokimia. 31
10.3.1. Media SIM (*Sulfida Indol Motility*). 31
10.3.2. Media KIA (*Kliger Iron Agar*). 31
10.3.3. Media LIA (*Lysine Iron Agar*). 32
10.3.4. Media Citrat. 32
11.Pembuatan suspensi bakteri uji. 32
12.Pengujian aktivitas antibakteri biji pinang. 33
12.1. Pengujian antibakteri secara difusi. 33
12.2. Pengujian antibakteri secara dilusi. 33
13.Pengujian kandungan senyawa dengan metode KLT 34
13.1 Identifikasi alkaloid. 34
13.2 Identifikasi saponin. 34
13.3 Identifikasi alkaloid 34
13.4. Identifikasi tanin. 34

E. Analisa Data..... 45
F. Skema..... 35
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN..... 39
A. Hasil Penelitian..... 39
1. Hasil identifikasi biji pinang (*Arecha catechu* L)..... 39
1.1 Determinasi tanaman. 39
1.2 Deskripsi tanaman..... 39
2. Hasil pengumpulan, pengeringan, pembuatan serbuk biji pinang... 39
3. Hasil penetapan kadar lembab serbuk biji pinang. 40
4. Hasil pembuatan ekstrak biji pinang..... 40
5. Hasil pengujian bebas etanol. 41
6. Hasil uji kandungan kimia ekstrak etanol biji pinang..... 41
7. Hasil fraksinasi ekstrak biji pinang..... 42
8. Pembuatan suspensi bakteri. 43
9.Hasil identifikasi bakteri uji. 43
9.1. Identifikasi bakteri secara goresan..... 43
9.2. Identifikasi bakteri uji secara pewarnaan gram. 43
9.3. Identifikasi bakteri uji secara biokimia..... 44
10.Pengujian antivitas antibakteri secara difusi. 45
11.Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi. 48
12.Hasil identifikasi fraksi paling aktif secara KLT..... 49
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN..... 52
A. Kesimpulan..... 52
B. Saran..... 52
DAFTAR PUSTAKA..... 53
LAMPIRAN.....58

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Buah pinang 5
Gambar 2. Skema jalannya penelitian 34
Gambar 3.Skema pembuatan ekstrak dan fraksinasi biji pinang 35
Gambar4. Skema pengujian antibakteri metode difusi 36
Gambar 5. Skema pengujian antibakteri metode dilusi 37

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah biji pinang..... 39
Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab biji pinang 39
Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi biji pinang 40
Tabel 4. Hasil pengujian bebas etanol 40
Tabel 5. Hasil uji kandungan kimia ekstrak etanol biji pinang 41
Tabel 6. Hasil fraksinasi ekstrak biji pinang 42
Tabel 7. Tabel hasil uji biokima 43
Tabel 8 Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi 45
Tabel 9. Hasil pengujian fraksi etil asetat secara dilusi 48
Tabel 10. Hasil pengujian KLT 49

Daftar Lampiran

Halaman

1. Determinasi tanaman 57
2. Pengolahan data dengan SPSS 58
3. Tanaman pinang *Areca catechu* L 72
4. Foto ekstrak biji pinang 73
5. Foto alat penelitian 74
6. Hasil uji bebas etanol, identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pinang..75
7. Foto hasil identifikasi bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031..... .76
8. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi,ekstrak biji pinang terhadap *Klebsiella pneunomiae* difusi konsentrasi 50%.....77
9. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi ,ekstrak etanol biji pinang terhadap *Klebsiella pneunomiae* difusi konsentrasi 25%.....78
10. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi ,ekstrak etanol biji pinang terhadap *Klebsiella pneunomiae* difusi konsentrasi 12,5%.....79
11. Hasil uji antibakteri fraksi teraktif etil asetat biji pinang terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 secara dilusi.....80
12. Hasil uji KLT fraksi teraktif etil asetat dan perhitungan Rf.....82
13. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah.....84
14. Perhitungan rendemen ekstrak etanol biji pinang.....85
15. Perhitungan rendemen fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari biji pinang.....86
16. Pembeuatan larutan berbagai konsentrasi metode difusi 87
17. Pembuatan larutan dengan berbagai konsentrasi.....88
18. Formulaasi dan pembuatan media.....89

INTISARI

DAMAS YBK., 2018, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI, FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR, EKSTRAK ETANOL BIJI PINANG (*Areca catechu* L) TERHADAP BAKTERI *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Biji pinang (*Areca catechu* L) merupakan tanaman suku Arecaceae / palmae yang dapat banyak ditemukan di sekitar kita dan dapat digunakan sebagai obat tradisional. Kandungan kimia biji pinang adalah flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari biji pinang (*Areca catechu* L) sebagai antibakteri terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 menggunakan metode dilusi dan difusi. Konsentrasi fraksi yang digunakan untuk metode difusi adalah 50%; 25%; 12,5%. Fraksi teraktif yang didapatkan adalah fraksi etil asetat yang digunakan untuk metode dilusi dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%. Fraksi paling aktif diuji kandungan kimia secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Hasil penelitian dengan metode difusi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dengan diameter hambat sebesar 24 mm pada konsentrasi 25%. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) aktivitas antibakteri fraksi teraktif etil asetat terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 adalah 6,25%. Hasil identifikasi KLT menunjukkan fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid, tanin dan saponin.

Kata kunci : Biji pinang, ekstraksi, fraksinasi, metode dilusi, metode difusi, *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031

ABSTRACT

DAMAS YBK., 2018, ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF, FRACTION *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT, AND WATER, EXTRACT ETHANOL OF PINANG SEED (*Areca catechu* L) AGAINST BACTERIA *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Areca catechu L is an Arecaceae / palmae plant that can be found around us and can be used as a traditional medicine. Chemical content of betel nuts are flavonoids, alkaloids, saponins, and tannins. The research aim to determined the activity of ethanol extract, fraction of n-hexane, ethyl acetate and water from Areca catechu L as antibacterial to *Klebsiella pneunimiae* ATCC 10031.

Antibacterial activity test of ethanol extract, *n*-hexane fraction, ethyl acetate fraction and water fraction again *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 used dilution and diffusion method. The fraction concentration used in the diffusion method is 50%; 25%; 12.5%. The most active fraction obtained was the ethyl acetate fraction used for dilution method with concentration of 50%; 25%; 12.5%; 6.25%; 3.12%; 1.56%; 0.78%; 0.39%; 0.19%; 0.09%. The most active fractions were tested for chemical content by Thin Layer Chromatography (TLC).

The result of the research by diffusion method showed that ethyl acetate fraction is the most actived fraction with 24 mm inhibitory diameter at 25% concentration. The concentration of Minimum Kill (KBM) activity of antibacterial fraction of actived ethyl acetate to Klebsiella pneunomiae ATCC 10031 is 6,25%. The identification result of TLC indicates ethyl acetate fraction contained flavonoid and saponin compound.

Keywords: betel nut, dilution method, diffusion method, *Klebsiella pneunomiae* ATCC 1003

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan penyebab salah satu masalah kesehatan yang paling utama di negara-negara berkembang termasuk di Indonesia. Berdasarkan hasil survey pada tahun 2007, penyebab utama dari kematian antara lain 28,1% yang disebabkan oleh penyakit infeksi dan parasit, 18.9% yang disebabkan oleh penyakit vaskuler dan 15,7% yang disebabkan karena penyakit pernafasan. Kenyataan ini menunjukan bahwa masih tingginya angka penyakit akibat infeksi di indonesia, untuk mengatasi masalah ini, obat anti infeksi yang berpotensi dan dapat diterima oleh masyarakat kalangan sosial rendah dan menengah harus segera ditemukan. Hal inilah yang mendorong dan mendasari pencarian sumber obat-obatan yang murah dan memiliki potensi antimikroba yang baik (Kumala & Siswanto 2007)

Berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) pada tahun 2013, menunjukkan prevalensi nasional Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA) di Indonesia yaitu sebesar 25%, sedangkan prevalensi pneunomia di Indonesia sebesar 4,5% dan di Jawa Tengah 5%. Bakteri yang dapat menyebabkan penyakit infeksi salah satu adalah bakteri *Klebsiella pneunomiae*. Bakteri ini merupakan gram negatif yang dapat menyebabkan penyakit terutama Infeksi Saluran Kemih (ISK), saluran pernafasan dan bakteremia terutama pada individu yang memiliki daya tahan tubuh yang lemah (Schroll, *et al.* 2010).

Penyakit pneunomia adalah penyakit infeksi saluran pernafasan bawah yang merupakan penyebab kematian terbesar terutama di negara-negara berkembang (Misnadiarly 2008). Pneunomia yang disebabkan *Klebsiella pneunomiae*, biasanya dimulai dengan gejala seperti demam akut, alaise (lesu), dan batuk kering. Kemudian, batuknya menjadi produktif menghasilkan spuntum berdarah dan purulent (nanah). Penyakit pneunomia yang berlanjut, akan terjadi abses, nekrosis jaringan paru bronkitis dan fibriosis paru-paru. Angka kematian pneunomia karena bakteri *Klebsiella pneunomiae* antara 40-60% (Entjang 2003).

Banyak faktor bakterial yang terlibat dalam mekanisme patogenik infeksi dari Klebsiella. Penelitian akhir yang fokus pada patogenisitas *Klebsiella sp* ada 5

faktor bakterial mayor yaitu kapsul, fimbriae (pili), resistensi serum, LPS, dan siderophores (Podschun 1998). Tiga komponen dari dinding luar bakteri gram negatif ini diperkirakan terlibat dalam berkembangnya imunitas adalah LPS, membran proteoglikan dan *Outer Membran* Protein (OMP). *Outer Membrane* Protein (OMP) atau afibrial adhesin adalah protein permukaan, melekat pada hospes lebih kuat dibandingkan dengan pili (Kisra 1995). Salah Satu dari mekanisme pertahanan lini pertama saluran nafas adalah *system secretory* IgA (sIgA), melindungi permukaan mukosa. s-IgA yang mempunyai sifat yang unik (valensi tinggi untuk ikatan antigen dan relatif resisten terhadap proteolisis mikroflora komensal) untuk memenuhi perannya pada mukosa (Pillete 2004).

Infeksi bakteri dapat diatasi dengan penggunaan antibiotik yang memiliki mekanisme aksi menghambat pertumbuhan bakteri. Penggunaan antibakteri secara terus menerus dapat menyebabkan kerusakan organ tubuh jika digunakan dalam dosis yang tidak tepat seperti amoxicilin yang dapat merusak organ hati. Kerusakan organ akibat antibiotik dapat diatasi salah satunya dengan cara menemukan senyawa antibakteri baru yang berasal dari bagian tanaman tertentu (Karadi *et al.* 2011).

Banyaknya penyakit infeksi yang belum dapat disembuhkan karena adanya resistensi terhadap antibiotik maka dipilih alternatif lain untuk menyembuhkan penyakit. Salah satunya dengan menggunakan tanaman tradisional. Penggunaan obat tradisional secara umum dinilai lebih aman dibanding penggunaan obat modern. Hal ini disebabkan karena obat tradisional dipercaya memiliki efek samping yang relatif lebih kecil dibanding dengan obat modern (Sari 2006).

Indonesia adalah negara yang kaya akan berbagai jenis tumbuhan. Tumbuh-tumbuhan tersebut telah digunakan oleh penduduk Indonesia sejak dahulu dalam berbagai bidang seperti industri, perkebunan, obat–obatan dan sebagainya. Tumbuhan yang digunakan sebagai obat dikenal dengan nama obat tradisional atau jamu. Jamu sampai sekarang masih banyak digunakan oleh masyarakat karena harga obat tradisional yang biasanya lebih murah dibandingkan dengan obat sintetis, karena bahan baku obat – obatan buatan pabrik sangat mahal dan harganya sangat bergantung pada banyak komponen.

Pinang atau *Areca catechu* L merupakan salah satu tumbuhan yang banyak ditemukan di Indonesia yang secara tradisional bijinya digunakan sebagai obat luka bakar. Pinang mudah tumbuh di daerah tropis dan biasa ditanam di pekarangan, taman, atau dibudidayakan. Pinang juga memiliki banyak kegunaan dari biji, daun, hingga pelepahnya. Biji pinang sebagai obat tradisional diantaranya sebagai obat cacingan, obat luka bakar, dan kudis. Masyarakat juga biasanya menggunakan biji pinang muda sebagai obat luka bakar dengan cara ditumbuk secukupnya kemudian ditempelkan langsung ke daerah yang mengalami luka bakar atau dengan cara merebus biji pinang dan air rebusannya digunakan untuk membersihkan bagian luka dan infeksi kulit lainnya (Sudarsono *el al.* 1996*)*

Biji pinang mengandung senyawa kimia alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin. Senyawa saponin mempunyai kemampuan sebagai pembersih sehingga efektif untuk menyembuhkan luka terbuka, sedangkan tanin dapat digunakan sebagai pencegahan terhadap infeksi luka karena mempunyai daya antiseptik dan obat untuk luka bakar, flavonoid mempunyai aktivitas sebagai antiseptik dan alkaloid memiliki kemapuan sebagai antibakteri (Harbone 1987).

Areca catechu L memiliki potensi antibakteri yang diketahui melalui pengujian terhadap bakteri-bakteri patogen yang sering digunakan dalam pengujian potensi senyawa antibakteri yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeroginosa*. Bakteri *S.aureus* mewakili dari bakteri gram positif dan baketri *P.aeroginosa* mewakili dari bakteri Gram negatif (Puspitawati 2013). Fraksi ekstrak etanol biji pinang terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* menunjukan hasil bahwa fraksi fraksi etil asetat, fraksi air dan fraksi *n*-heksana memiliki aktifitas antibakteri (Perdina 2014). Menurut penelitian Ayessa (2013) ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* dan *Pseudomonas aeroginosa*. Diameter hambat yang didapat sebesar 9 mm pada konsentrasi 70% pada bakteri *Klebsiella pneunomiae* dan 8 mm untuk 30%, 11 mm untuk 50% dan 12 mm untuk 70% pada bakteri *Pseudomonas aeroginosa*. Pada penelitian terhadap ekstrak daun pinang (*Areca catechu* L.) terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* dan *Bacillus subtilis* didapatkan zona hambat sebesar 13 mm dan 11,33 mm. Ekstrak akar pinang (*Areca catechu* L.) terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* dan *Bacillus subtilis* didapat zona hambat

sebesar 12,33 mm dan 10,33 mm sehingga dinyatakan tanaman pinang memiliki aktivitas antibakteri (Ambika & Rajagopal 2017).

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, permasalahan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

Pertama, apakah fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol biji pinang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031?

Kedua, manakah antara fraksi *n*-heksana, etil asetat dan fraksi air dari ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) memiliki aktivitas antibakteri yang lebih efektif dalam menghambat bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031?

Ketiga, berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KMH) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang memiliki aktivitas antibakteri yang paling efektif dalam menghambat bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031?

C. Tujuan Penelitian

Pertama, mengetahui aktivitas fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

Kedua, untuk mengetahui yang paling aktif aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

Ketiga, untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif.

D. Manfaat penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan bahan untuk industri farmasi guna mengembangkan obat yang berasal dari tanaman herbal yaitu biji pinang (*Areca catechu* L.) sebagai salah satu alternatif pengobatan penyakit infeksi khususnya yang disebabkan oleh bakteri *Klebsiella pneunomiae.* Penelitian ini

dalam dunia pendidikan dapat dilakukan penelitan kembali yang lebih mendalam tentang potensi biji pinang (*Areca catechu* L.).

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Pinang

1. Sistematika tanaman pinang

Sistematika tanaman pinang menurut Syamsuhidayat and Hutapea (1991) adalah:

Gambar 1. Biji pinang.

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Bangsa	: Arecales
Suku	: Arecaceae / palmae
Marga	: Areca
Spesies	: *Areca catechu* L

2. Nama lain

Pohon pinang memiliki nama yang berbeda-beda pada setiap daerah di Indonesia seperti pineng, di daerah Aceh pinang disebut pineung, di Gayo disebut pinang. Daerah Karo pinang kenal dengan nama batang mayang, di Toba dikenal dengan nama pining, di Minangkabau pinang disebut dengan batang piang dan di daerah Jawa dan Sunda pinang dikenal dengan nama jambe (Depkes 1989).

3. Morfologi tanaman

Tanaman pinang dengan 6 latin *Areca catechu* L adalah tamanan dengan famili Arecaceae yang dapat tumbuh mencapai tinggi kurang lebih 15-20 meter dengan batang yang tegak lurus dan memiliki garis tengah 15 cm. Buahnya berkecambah setelah 1,5 bulan setelah tumbuh dan pada usia 4 bulan akan memiliki

jambul daun-daun kecil yang belum terbuka. Pembentukan batang pinang baru akan terjadi setelah berusia 2 tahun dan akan mulai berbuah pada usia 5-8 tahun tergantung pada keadaan tanah. Pohon pinang akan mulai berbunga pada awal dan akhir musim penghujan dan memiliki masa hidup tanaman selama kurang lebih 25-30 tahun. Biji buah pinang memiliki warna kecoklatan sampai coklat kemerahan, berlekuk lekuk dengan warna lekukan yang lebih muda. Pada bidang irisan biji pinang akan tampak perisperm yang berwarna coklat tua dengan lipatan yang tidak beraturan terlihat menembus endosperm yang berwarna agak keputihan (Syamsuhidayat and Hutapea 1991).

4. Kandungan kimia

Kandungan kimia dari biji pinang adalah alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin (Nony 2013) :

4.1 ***Alkaloid.*** Alkaloid adalah suatu golongan senyawa yang tersebar luas hampir semua jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung satu atom nitrogen yang biasanya membentuk cincin heterosiklik. Alkaloid dapat ditemukan pada daun, biji, ranting, dan kulit kayu dari tumbuhan. Kadar alkaloid dari tumbuhan dapat mencapai 10-15%. Alkaloid kebanyakan bersifat racun tetapi ada pula yang sangat berguna bagi pengobatan. Alkaloid merupakan senyawa tanpa warna, seringkali bersifat optik aktif, berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotin) pada suhu kamar (Harborne 1984). Alkaloid dapat berfungsi mengganggu terbentuknya jembatan seberang silang komponen penyususn dari peptigoglikan pada sel bakteri sehingga dinding sel bakteri tidak dapat terbentuk secara utuh (Azijah 2004)

4.2 ***Flavonoid.*** Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder dengan struktur inti C_6-C_3-C_6 yaitu dengan dua cincing aromatik yang dihubungkan dengan atom C dengan ikatan atom O yang berupa ikatan oksigen heterosiklik. Flavonoid juga dapat di golongkan ke dalam golongan polifenol karena memiliki 2 atau lebih gugus hidroksil yang bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Pada umumnya flavonoid berikatan dengan gula dan membentuk glikosida yang berakibat senyawa ini akan lebih mudah larut terhadap pelarut yang bersifat polar seperti : metanol, etanol, butanol, dan etil asetat. Bentuk glikosida dari flavonoid memiliki warna yang lebih pucat dibanding aglikon. Bentuk aglikon memiliki sifat

yang kurang polar sehingga lebih mudah larut dalam pelarut kloroform dan eter (Hanani 2014). Senyawa flavonoid dapat berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ektraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Dewanti & Wahyudi 2011).

4.3 ***Tanin.*** Tanin merupakan suatu senyawa polifenol yang tersebar luas pada tumbuhan, dan pada beberapa tanaman yang terdapat pada jaringan kayu seperti kulit batang dan jaringan lain seperti pada buah dan daun. Tanin memiliki bentuk amorf yang menyebabkan terbentuknya koloid dalam air, memiliki rasa yang sepat, protein yang mengendap menghambat kerja enzim proteolitik, dan digunakan di industri untuk penyamakan kulit hewan. Sifat tanin yang sebagai astrigen sering dimanfaatkan sebagai anti diare, menghentikan pendarahan dan mencegah peradangan terutama peradangan di mukosa mulut (Hanani 2014). Senyawa tanin mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasi protein, yaitu melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Dewanti & Wahyudi 2011).

4.4 ***Saponin.*** Saponin adalah suatu senyawa yang memiliki bobot molekul yang tinggi atau besar, tersebar dalam beberapa tumbuhan, merupakan bentuk glikosida dengan molekul gula yang terikat dengan aglikon triterpen atau steroid. Molekul gula biasanya terikat pada gugus OH terutama pada posisi C-3 atau pada 2 gugus OH atau pada satu gugus OH dan satu gugus COOH. Saponin larut dalam air, tidak larut dalam eter dan jika dihidrolisis akan menghasilkan aglikon. Beberapa triterpen memiliki rasa pahit seperti limonin yang terdapat dalam buah jeruk, terutama pada bagian kulit, kukurbitasin yang terdapat pada biji labu merah, sedangkan glisirizin yang terdapat dalam akar manis memiliki rasa manis (Hanani 2014). Saponin adalah senyawa glikosida yang dapat berfungsi untuk menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri. Hal ini mengakibatkan pelisisan pada sel bakteri (Hassan 2008).

5. Perkembangan penelitian biji pinang

Penelitian dari Puspawati (2013) menjelaskan bahwa ekstrak biji pinang mempunyai aktivitas antibakteri dengan variasi konsentrasi 1,57%, 3,13%, 6,25% hingga 50%. Konsentrasi 1,57% dianggap sebagai konsentrasi paling efektif untuk menghambat bakteri *S.aureus* dan dengan konsentrasi 25% paling efektif untuk

membunuh bakteri *Pseudomonas aeroginosa.* Penelitian yang dilakukan Nursidika (2014) tentang pengujian fraksi ekstrak etanol biji pinang terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* menunjukan hasil bahwa fraksi fraksi etil asetat, fraksi air, dan fraksi *n*-heksana memiliki aktifitas antibakteri dengan ditemukannya KHM fraksi etil asetat fraksi air, dan fraksi *n*-heksana pada bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* sebesar 1.204 µg/ml, 256 µg/ml dan 1.204 µg/ml. Menurut penelitian Ayessa (2013) ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* dan *Pseudomonas aeroginosa*. Diameter hambat yang didapat sebesar 9 mm pada konsentrasi 70% pada bakteri *Klebsiella pneunomiae* dan 8 mm untuk 30%, 11 mm untuk 50% dan 12 mm untuk 70% pada bakteri *Pseudomonas aeroginosa*. Pada penelitian terhadap ekstrak daun pinang (*Areca catechu* L.) terhadap bakteri *Klebsiella pnaunomiae* dan *Bacillus subtilis* didapatkan zona hambat sebesar 13 mm dan 11,33 mm. Ekstrak akar pinang (*Areca catechu* L.) terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* dan *Bacillus subtilis* didapat zona hambat sebesar 12,33 mm dan 10,33 mm sehingga dinayatakan tanaman pinang memiliki aktivitas antbakteri (Ambika & Rajagopal 2017).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, simplisia adalah bahan yang dikeringkan. Simplisia dapat berupa simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Simplisia hewani adalah simplisia yamg berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan merupakan zat kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia yang berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan berupa zat kimia murni (Depekes 1985).

2. Pengumpulan simplisia

Kadar senyawa aktif dalam suatu simplisia berbeda-beda tergantung pada bagian tanaman yang digunakan, umur tanaman, atau bagian tanaman pada saat

dipanen, waktu pemanenan dan lingkungan tempat tumbuh. Bagian yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian biji (Depkes 1985).

3. Pemilihan simplisia

Waktu pemanenan berhubungan sangat erat dengan pembentukan senyawa aktif dalam bagian tanaman yang akan dipanen. Waktu panen yang tepat pada bagian tanamana tersebut mengandung senyawa aktif dalam jumlah yang besar. Pemilihan simplisia digunakan untuk memisahkan simplisia dari partikel asing yang merugikan. Simplisia nabati harus bebas dari serangga dan kotoran hewan, bau dan warnanya tidah boleh menyimpang, tidak boleh mengandung lendir atau ditemukan tanda adanya pengotor lain serta tidak boleh berbahaya dan beracun (Depkes 1985).

4. Pengeringan

Tujuan utama dari pengeringan simplisia adalah mengurangi kadar air yang terdapat dalam simplisia sehingga simplisia tidak mudah rusak, berjamur, atau kandungan bahan aktif berubah jika disimpan dalam waktu cukup lama. Sebelum proses pengeringan simplisia seperti rimpang, batang, atau kulit kayu dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan. Pengeringan yang dilakukan secara alami, dilakukan dengan menjemur di bawah sinar matahari langsung. Simplisia ini diharapkan merata setipis mungkin dengan alas tikar atau plastik dengan sambil sering dibalik agar keringnya merata (Dalimartha 2008).

5. Pembuatan serbuk

Guna meningkatkan luas permukaan dari bahan alam sehingga senyawa kimia yang terdapat dalam tumbuhan dapat ditarik secara optimal maka perlu dilakukan penyerbukan. Biji pinang yang sudah dikeringkan dengan cara diblender dan diayak, kemudian dilakukan perhitungan bobot kering terhadap bobot basah biji pinang (Voigt 1995).

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan senyawa kimia dari matriks atau simplisia dengan menggunakan metode dan pelarut yang sesuai. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada jenis, sifat fisik dan sifat kimia kandungan kimia senyawa

dari yang ingin diekstraksi. Pemilihan pelarut berdasarkan tergantung pada polaritas senyawa yang akan disari dimulai dari senyawa non polar, semi polar, dan polar (Hanani 2014).

2. Metode ekstraksi

2.1 ***Maserasi.*** Maserasi adalah metode ekstraksi simplisia dengan cara merendam simplisia dalam pelarut pada suhu kamar sehingga kerusakan dari metabolisme dapat dihindari. Pada metode maserasi terjadi kesetimbangan antara pelarut yang berada didalam dan diluar sel sehingga memerlukan penggantian pelarut secara berulang (Hanani 2014).

2.2 ***Perkolasi.*** Perkolasi adalah metode penyarian simplisia menggunakan pelarut yang selalu baru. Metode perkolasi memerlukan waktu yang lebih lama, untuk memastikan keberhasilan perkolasi perkolat dapat diuji dengan pereaksi spesifik (Hanani 2014).

2.3 ***Refluks.*** Refluk adalah metode penyarian dengan menggunakan pelarut yang berada pada suhu titik didihnya selama waktu tertentu dan dengan pelarut yang relatif konstan dan pendinginan balik. Cara mendapat hasil yang sempurna dilakukan 5-6 kali pengulangan terhadap residu pertama. Metode ini memungkinkan terjadinya penguraian terhadap senyawa yang tidak tahan panas (Hanani 2014).

2.4 ***Soxhletasi.*** Soxhletasi adalah metode penyarian dengan pelarut pada suhu didih dengan menggunakan alat soxhlet. Pemanasan pada pelarut menyebabkan pelarut menguap dan uap masuk pada labu pendingin. Hasil dari kondensasi pelarut jatuh pada bagian simplisia sehingga terjadi penyarian yang terus menerus (Hanani 2014).

2.5 ***Infusa.*** Infusa adalah metode penyarian dengan menggunakan pelarut air dengan suhu 96-98ºC selama 15-20 menit (saat suhu 96ºC tercapai). Bejana infusa tercelup pada tangas air. Cara ini sesuai untuk simplisia yang bersifat lunak seperti bunga dan daun (Hanani 2014).

2.6 ***Dekok.*** Dekok adalah metode penyarian yang mirip dengan infusa tetapi waktu lebih lama yaitu 30 menit dan suhu pelarut mencapai tititk didih (Hanani 2014).

2.7 ***Destilasi.*** Destilasi adalah metode penyarian dengan cara menarik senyawa yang dapat ikut menguap bersama uap air. Pada proses pendinginan, senyawa dan uap akan terkondensi dan terpisah menjadi destilat air dan senyawa yang di ekstraksi (Hanani 2014)

3. Fraksinasi

Ekstrak etanol adalah campuran dari berbagai senyawa. Ekstrak etanol sulit dipisahkan menggunakan teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak etanol perlu dipisahkan dengan metode fraksinasi. Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama, kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawanya yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, semi polar akan masuk ke pelarut semi polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (Mukhriani 2014; Tiwari *et al.* 2011).

4. Pelarut

Pemilihan pelarut harus mempertimbangkan beberapa faktor yaitu murah, mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidah mudah menguap dan tidah mudah terbakar, selektif yang hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat, sehingga pelarut yang digunakan antara lain :

4.1 ***Etanol 96%.*** Etanol merupakan senyawa organik dengan rumus kimia C_2H_5OH atau disebut juga etil alkohol yang di pasaran lebih dikenal dengan sebagai alkohol. Etanol 96% adalah larutan serbaguna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan agar diperoleh hasil yang baik, penyarian biasanya menggunakan campuran antara etanol dengan air. Etanol 96% dipertimbangkan sebagai penyari karena lebih efektif dalam menghasilkan jumlah bahan yang optimal dan bahan yang diperlukan hanya sedikit yang turut dalam pengekstraksi. Keuntungan dari etanol 96% adalah tidak beracun, absobsinya baik, sulit ditumbuhi mikroorganisme, efektif dalam menghasilkan zat aktif yang optimal dimana zat pengokor hanya sedikit yang terdapat dalam larutan ekstrak, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan dan dapat melarutkan alkaloid, minyak menguap, glikosida,

kurkumin, antrakinon, flavonoid, steroid, damar, klorofil, tanin, dan saponin (List 2000).

4.2 ***n-heksana.*** Pealrut *n*-heksana adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih terdiri dari suatu campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna atau pucat, transparan, bersifat volatile, mudah terbakar, bau karakteristik eter (Martindale 1993). Pelarut *n*-heksana dapat melarutkan senyawa yang bersifat non polar seperti terpenoid, tripernoid, dan sterol, alkaloid, fenil peropanoid (Depkes 1987).

4.3 ***Etil asetat.*** Etil asetat adalah pelarut semi polar, memiliki sifat yang mudah menguap dan terbakar, maka untuk penyimpanan etil asetat harus dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari paparan sinar matahari. Etil asetat merupakan suatu cairan jernih tidak berwarna, bau khas seperti buah, larut dalam 15 bagian air, dapat bercampur dalam eter, etanol, dan kloroform (Depkes 1986). Senyawa yang larut dalam pelarut ini adalah flavonoid, alkaloid, dan polifenol (Harbone 1987).

4.4 ***Air.*** Air bersifat polar yang dipertimbangkan sebagai pelarut karena memiliki sifat yang stabil, tidak mudah menguap, murah, mudah didapat, tidak mudah terbakar, tidak beracun, dan alamiah. Air juga dapat melarutkan gula, pati, gom, enzim, protein, minyak menguap, lemak peptida, zat pewarna, garam alkaloid, dan asam organik (List & Schamidt 2000)

D. Klebsiella pneunomiae

1. Sistematika bakteri

Sistematika bakteri *Klebsiella pneunomiae* menurut Rahardja (2006) sebagai berikut :

Regnum : Bacteria
Filum : Preoteobacteria
Kelas : Gamma Proteobacteria
Ordo : Enterobacterials
Familia : Enterobacteraceae
Genus : Klebsiella
Spesies : *Klebsiella pneunomiae*

2. Morfologi dan sifat bakteri

Klebsiella pneunomiae adalah baketri gram negatif yang berbentuk batang pendek, mempunyai ukuran 0,5 µm x 3,0 µm, mempunyai selubung/kapsul, tidak memiliki spora dan tidak memiliki flagel, mengurai laktosa, menbentuk kapsul baik secara *invivo* atau *invitro* sehingga koloni berlendir (mukoid) (Rahardja 2006).

3. Patogenesis

Flora endogen menjadi patogen ketika memasuki saluran pernafasan. *Klebsiella pneunomiae* masuk kedalam jaringan paru melalui saluran pernafasan. Proses masuknya dimulai penghancuran jaringan, terbentuk daerah purulen, dan nekrosis parenkim paru, bronkiektasis, bakteri masuk dalam aliran darah, septicemia, abses liver. Bakteri *Klebsiella pneunomiae* sering menimbulkan infeksi pada traktus urinarius karena infeksi nosokomina, mengitis, dan pneunomia pada penderita diabetes melitus dan pecandu alkohol. Bakteri ini menimbulkan gejala demam akut, malaise dan batuk kering yang berlanjut menjadi batuk produktif serta menghasilkan sputum berdarah dan pirulent. Infeksi bakteri *Klebsiella pneunomiae* terus berlanjut akan terjadi abses nekrosis jaringan paruh, bronkiektasis dan fibrosis paru (Fatimah 2010).

4. Toksin

Klebsiella pneunomiae dapat menyebabkan konsolidasi hemogarik yang luas pada paru-paru. Bakteri *Klebsiella Pneunomiae* menyebabkan infeksi saluran kemih dan bacteremia dengan lesi fokal pada penderita yang lemah (Rahardja 2006).

5. Pengobatan

Infeksi saluran pernafasan yang disebabkan oleh bakteri *Klebsiella pneunomiae* disarankan dengan antibiotik β-laktam, kuinolon dan aminoglikosida. Antibiotik yang dapat di gunakan untuk pengobatan bakteri *Klebsiella pneunomiae* adalah penisilin, amoksisilin, siprofoksasin, cefenepine, cefftaxidine (Katzung 2007).

E. Antibakteri

1. Definisi

Antibakteri adalah suatu senyawa yang dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan suatu mikroorganisme (*Jawetz*

et al. 2007). Beberapa istilah yang digunakan untuk menjelaskan proses pembasmian bakteri yaitu germasid, bakterisid, bakteriostatik, antiseptik, desinfektan (Dianasari 2009).

Proses pembasmian bakteri secara germasid adalah bahan yang digunakan untuk membasmi mikroorganisme dengan cara mematikan sel-sel vegetatif dari bakteri, tetapi tidak selalu mematikan bentuk-bentuk sporanya. Bakteriasid adalah bahan yang digunakan untuk memamatikan bentuk-bentuk vegetatif dari bakteri. Bakteristatik adalah suatu bahan yang memiliki kemampuan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme dengan cara mencegah pertumbuhan dari bakteri tanpa mematikan bakteri tersebut. Antiseptik adalah suatu bahan yang digunakan untuk menghambat atau membunuh mikroorganimse dengan mencegah pertumbuhan atau menghambat aktivitas metabolisme, digunakan pada jaringan hidup. Desinfektan adalah bahan yang dipakai untuk membasmi bakteri dan mikroorganisme patogen tetapi belum tentu beserta sporanya digunakan pada benda mati (Pelczer & Chan 1988).

2. Mekanisme kerja antibakteri

2.1 ***Penghambat metabolisme sel bakteri.*** Mikroba membutuhkan asam folat untuk menjaga kelangsungan hidupnya. Bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari Asam Para Amino Benzoat (PABA) yang di gunakan untuk kebutuhan hidupnya. Antibakteri jika bersaing dengan dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembuatan asam folat, maka akan terbentuk analog asam folat non fungsional, sehingga kebutuhan akan asam folat tidak terpenuhi, hal ini bisa menyebabkan bakteri mati (Gunawan & Mayuni 2009).

2.2 ***Penghambat sintesis dinding sel.*** Dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan yaitu suatu komplek polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel bakteri dapat dirusak dengan cara memnghambat pembentukannya atau mengubah setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis pada bakteri (Gunawan & Mayuni 2009).

2.3 ***Perubahan permeabilitas sel bakteri.*** Selaput sel bakteri berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Kerusakan beberapa membran sel

menyebabakan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba seperti protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain (Gunawan & Mayuni 2009).

2.4 ***Penghambatan sintesis protein sel bakteri.*** Bakteri memerlukan sintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan *mRNA* yang salah dibaca oleh *tRNA*. Antibakteri bekerja dalam menyebabkan kode pada *mRNA* yang salah dibaca *tRNA* pada sintesis protein yang abnormal dan fungsional bagi sel mikroba (Gunawan & Mayuni 2009).

2.5 ***Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri.*** Antibiotik yang mekanisme kerjanya penghambatan asam nukleat contohnya adalah rifampisin yang berkaitan dengan enzim polimerase RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA sel mikroba begitu juga dengan golongan kuinolon yang menghambat enzim DNA girase pada kuman yang berfungsi membentuk kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa memuat sel kuman yang kecil sekalipun (Gunawan & Mayuni 2009).

F. Uji Aktivitas Antibakteri

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

1. Metode difusi

Metode dilusi dilakukan untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) masing-masing fraksi terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae*. Pertumbuhan bakteri yang terhambat atau kematian bakteri yang diakibatkan karena suatu zat antibakteri dapat terjadi karena penghambatan terhadap metabolisme dari sel mikroba, sintesis dinding sel, penghambatan terhadap permeabilitas membran sel, penghambatan terhadap sintesis protein, dan penghambatan terhadap sintesis asam nukleat. Secara garis besar bakteri gram positif akan lebih rentan terhadap antibakteri karena memiliki lapisan peptidoglikan pada bagian luar yang permeabel sehingga lebih mudah dimasuki oleh zat antibakteri sedangkan bakteri gram negatif memiliki membran fosfolipid yang

tersusun atas polisakarida sehingga membuat dinding sel gram negatif impermeabel terhadap masuknya zat antibakteri (Ravikumar *et al*. 2011).

Parameter yang digunakan dalam uji dilusi adalah Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Hasil KBM diperoleh dengan mengamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37ºC yang ditunjukan dengan kejernihan media uji. Pelarut DMSO membantu melarutkan fraksi polar, semi polar, dan non polar sehingga fraksi dapat terdistribusi merata pada media. Kadar obat yang berada di bawah Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menunjukkan bahwa efek terapi tidak akan tercapai. Nilai KBM suatu obat terhadap bakteri berubah sesuai perkembangan resistensi dari bakteri tersebut (Prasetyo 2012).

2. Metode dilusi

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

Fraksi teraktif diujikan secara difusi untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Nilai diameter hambat adalah kemampuan dari fraksi teraktif biji pinang untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Prasetyo 2012).

G. Media

1. Pengertian media

Media adalah kumpulan zat organik yang digunakan sebagai tempat menumbuhakan bakteri dengan cara tertentu. Bakteri sebagai makhluk hidup mempunyai kebutuhan dasar yang meliputi air, karbon, energi, mineral dan faktor tumbuh. Keasaman (pH) medium sangat penting bagi organisme terutama kerja enzim sangat dipengaruhi oleh pH. Kandungan zat organik dalam media berbeda-beda pada setiap medianya sehingga berbeda jenis bakteri belum tentu dapat sama-sama hidup dalam media yang sama.(Hadioetomo 1985).

2. Macam-macam bentuk media

2.1 ***Media padat.*** Pembuatan media padat dengan cara bahan media padat ditambahakan antara 12-15 gram tepung agar-agar per 1000 ml media. Media ini pada umumnya dipergunakan untuk bakteri, ragi, jamur, dan mikroalga (Suriawiria 2005).

2.2 ***Media cair.*** Media cair tidak ditambahkan zat pemadat biasanya media cair dipergunakan untuk pembiakan mikroalga tetapi juga mikroba lain, terutama bakteri dan ragi (Suriawiria 2005).

2.3 ***Media semi cair atau semi padat.*** Penambahan zat pemadat dalam media ini hanya 50% atau kurang dari seharusnya. Media ini umumnya dipergunakan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup anaerob atau fakultatif (Suriaworia 2005).

3. Jenis jenis pertumbuhan bakteri

3.1 ***Media sintetik.*** Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri kemoheterotrof. Pada uji kadar vitamin secara mikribiologis, media yang di gunakan harus mengandung semua faktor pertumbuhan yang diperlukan oleh bakteri kecuali vitamin yang di uji. Media, bahan media, dan bakteri yang kemudian disatukan, kemudian di lakukan pengamatan pada bakteri. Pertumbuhan bakteri akan berbanding lurus dengan kadar asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri dan akan sebanding juga dengan jumlah vitamin dalam bahan uji (Radji 2011).

3.2 ***Media komplek.*** Media komplek adalah media yang digunakan secara rutin di laboratorium. Media ini mengandung nutrisi tinggi yang terdiri dari ekstrak ragi, ekstrak daging, atau tumbuhan, ataupun protein sederhana dari sumber lain. Vitamin, mineral, dan bahan organik lain yang diperoleh dari ekstrak daging atau ragi merupakan sumber nutrisi tumbuh bakteri. Media kompleks yang berbentuk cair disebut *nutrient broth*, sedangkan yang ditambahkan agar disebut *nutrient agar* (Radji 2011).

3.3 ***Media biakan khusus.*** Penanaman bakteri anaerob harus menggunakan media spesial disebut reducting media yang mengandung natrium tioglikolat. Media ini sebelum digunakan dipanaskan perlahan lahan untuk menghilangkan oksigen yang terserap. Bejana anaerob digunakan untuk

menginkubasi bakteri anaerob dengan cara diinkulasikan dalam media agar di dalam cawan petri (Radji 2011).

3.4 ***Media selektif dan diferensial.*** Media ini digunakan untuk mendeteksi ada tidaknya bakteri spesifik yang berhubungan dengan penyakit atau sanitasi yang buruk. Media selektif dirancang untuk menekan pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan dan mendukung pertumbuhan bakteri yang diinginkan. Sebagai contoh, *Bismuth Sulfat Agar* (BSA) digunakan untuk mengisolassi bakteri *Sallmonela tyhpy* dari tinja. Media diferensial memudahkan perbedaan koloni bakteri yang diinginkan dari koloni lain yang tumbuh pada lempeng media yang sama. Karakateristik selektif dan diferensial kadang-kadang dikombinasikan dalam satu jenis media (Radji 2011).

3.5 ***Media biakan khusus.*** Media ini digunakan untuk menentukan tipe pertumbuhan mikroba dan kemampuannya untuk mengadakan perubahan kimia tertentu. Bakteri aerob memerlukan CO_2 dengan konsentrasi lebih tinggi ataupun lebih rendah dari pada konsentrasi CO_2 di udara, maka konsentrasi CO_2 pada media ini dinaikkan (Radji 2011).

3.6 ***Media pengayakan.*** Media yang digunakan untuk pengayakan biakan bakteri biasanya dalam bentuk media cair dan hampir sama dengan media selektif, tetapi dirancang untuk memperbanyak tipe bakteri yang diinginkan sehingga dapat dideteksi. Tahapan pengayakan adalah upaya menumbuhkan bakteri dalam beberapa kali pemindahan ke media yang baru. Ketika biakan pengayakan terakhir desebarkan ke atas media padat yang mengandung komposisi yang sama dengan media cair, hanya koloni yang mampu menggunakan fenol yang bertahan tumbuh (Radji 2011).

H. Sterilisasi

Sterilisasi adalah salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk memusnahkan/mematikan mikroorganisme. Pemanasan merupakan salah satu cara yang paling umum digunakan dalam membunuh mikroorganisme beserta sporanya. Selain itu, bahan-bahan kimia tertentu juga dapat digunakan sebagai desinfektan. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi efektifitas dari prosedur pemusnahan/ mematikan mikrooganisme adalah: konsentrasi senyawa dari zat antimikroba, pengaruh dari lingkungan atau keberadaan zat-zat organik yang dapat menghambat

antimikroba kimiawi, sifat-sifat mikroba dan daya tahan mikroba terhadap efektivitas prosedur pemusnahan (Radji, 2011).

1. Cara sterilisasi

Selama ini kita mengenal 5 metode sterilisasi akhir, termasuk cara pemisahan bakteri dengan cara penyaringan serta pedoman dari aseptik.

1.1 ***Sterilisasi uap.*** Sterilisasi uap adalah sterilisasi yang paling sering digunakan dengan proses sterilisasi termal menggunakan uap jenuh yang dilakuakan dalam suatu bejana yang disebut autoclaf pada suhu 121 ^{0}C selama 15 menit. Prinsip dasar sterilisasi ini adalah uap dalam bejana sterilisasi digantikan dengan uap jenuh menggunakan alat pembuka dan penutup khusus. Siklus yang terjadi selama prosoes sterilisasi adalah evakuasi uap dan udara (Anonim 2013).

1.2 ***Sterilisasi panas kering.*** Strelisisasi panas kering adalah sterilisasi termal yang dilakukan pada suatu proses bets dalam suatu oven yang telah dirancang khusus. Oven ini dilengkapi dengan udara yang dipanaskan dan disaring yang diedarkan secara merata ke seluruh bagian bejana dengan sirkulasi atau radiasi dengan menggunakan semprotan bersensor (Anonim 2013).

1.3 ***Sterilisasi gas.*** Sterilisasi gas adalah metode sterilisasi alternatif untuk bahan-bahan yang tidak tahan panas pada sterilisasi uap dan sterilisasi uap kering. Bahan yang paling sering digunakan pada strerilisasi gas adalah etilen oksida. Kelemahan dari bahan ini adalah sifatnya yang mudah terbakar walaupu sudah dicampur dengan bahan inert yang sesuai, bersifat mutagenik dan kemugkinan bersifat toksik terhadap bahan yang mengandung ion klorida. Pada sterilisasai ini bejana dirancang mirip dengan atoklaf yang ditambah bagian khusus untuk proses penambahan gas (Anonim 2013).

1.4 ***Sterilisasi dengan radiasi ion.*** Metode ini dapat digunakan pada bahan obat dan bentuk sediaan akhir. Keunggulan dari metode ini adalah reaktivitas kimia rendah, residu rendah dapat diukur dan variabel yang dikendalikan rendah. Ada 2 jenis radiasi ion yaitu disintegrasi radioaktif dari radioisotop (radiasi gamma) dan radiasi berkas elektron. Pada kedua metode ini dosis harus diatur sedemikian mungkin sehingga sediaan yang disterilkan dapat di terima (Anonim 2013).

1.5 ***Sterilisasi dengan penyaringan.*** Strerilisasi ini digunakan untuk cairan yang labil terhadap panas yang dilakukan menggunkan bahan yang dapat

menahan mikroba sehingga mikroba dapat tertahan dan dapat disaring secara fisika. Perangkat penyaring biasanya terdiri dari matriks berpori bertutup kedap atau rangkaian wadah yang tidak permeabel. Keefektifan dari suatu media penyaring ditentukan oleh ukuran pori-pori media dan daya absorbsi mikroba terhadap zat yang terdapat dalam matriks atau tergantung juga terhadap mekanisme dari pengayakan (Anonim 2013).

I. Ciprofloksasin

Antibiotik golongan flurokuinolon merupakan obat bakterisidal yang kuat terhadap bermacam-macam mikroorganisme. Target antibiotik ciprofloksasin adalah DNA ginase bakteri dan topoisomerase IV. Topoisomerase IV adalah target primer untuk sejumlah bakteri gram negatif. Ciprofloksasin menghambat gulungan (supercoling) DNA yang diperantarai oleh girase pada konsentrasi yang berhubungan dengan kerja antibakteri efektifnya. Mutasi gen adalah dapat memberikan resistensi terhadap obat tersebut. Topoisomerase IV memisahkan molekul DNA tertaut silang yang dihasilkan dari replikasi DNA dan juga merupakan target dari ciprofloksasin (Goodman & Gilman 2010).

Ciprofksasin memiliki efek samping seperti mual ringan, muntah, gangguan abdominal, diare dan kolitis jarang terjadi, sakit kepala ringan, pening, halusinasi, delirium, dan seizure sangat jarang terjadi, ruam, reaksi fotosensitivitas, leukopenia, eosinofilia (Goodman & Gilman 2010).

Resistensi terhadap golongan antibiotik kuinolon dapat berkembang melalui mutasi dalam gen kromosom bakteri yang mengkode DNA gyrase atau topoisomerase IV atau melalui trasnpor aktif obat keluar dari bakteri. Tidak ada mekanisme penginaktivasi kuinolon yang telah teridentifikasi. Sensitivitas telah menurun, pada *Salmonella, Neisseria gonorrhoeae* dan *Streptococcus pneumonie* (Goodman & Gilman 2010).

J. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan suatu metode yang digunakan untuk melakukan pemisahan kandungan dalam suatu zat. KLT adalah suatu teknik pemisahan dengan menggunakan adsorben (fase stasioner) berupa lapisan tipis

yang seragam disalutkan pada permukaan bidang datar dapat berupa lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Pengembangan kromatografi terjadi ketika fase gerak tertapis melewati adsorben (Deinstrop & Elke 2007). Prosedur pengujian menggunakan KLT dilakukan untuk lebih menegaskan hasil yang didapat dari skrining fitokimia. Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah salah satu metode yang diharapkan dapat digunakan untuk penentuan kadar senyawa karena relatif sederhana, tidak mahal, dan bila menggunakan fase gerak yang cocok. Kelebihan dari KLT antara keserbagunaan, kecepatan, dan kepekaan, karena dapat berfungsi sebagai penegasan, maka uji KLT hanya dilakukan untuk golongan-golongan senyawa yang menunjukkan hasil positif pada skrining fitokimia seperti alkaloid, saponin, flavonoid, steroid, tanin, dan lain-lain (Marliana *et al*. 2005; Hilmi *et al*. 2013).

K. Landasan Teori

Klebsiella pneunomiae adalah salah satu bakteri yang yang telah dikenal lama dapat menyebabkan penyakit pneunomia. *Klebsiella pneunomiae* memiliki bentuk batang pendek, mempunyai ukuran 0,5 µm x 3,0 µm. *Klebsiella pneunomiae* masuk kedalam jaringan paru melalui saluran pernafasan. Terjadi penghancuran jaringan, terbentuk daerah purulen, dan nekrosis parenkim paru, bronkiektasis, bakteri masuk dalam aliran darah, septicemia, abses liver.

Tanaman obat telah banyak diketahui mempunyai kemampuan utuk menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat menyembuhkan penyakit infeksi akibat bakteri. Tanaman tradisional juga diketahui memiliki efek samping yang lebih kecil dibanding obat kimia. Salah satu tanaman yang dipercaya memiliki sifat antibakteri adalah biji Pinang (*Areca catechu* L.). Masyarakat pada umumnya telah banyak mengenal tanaman ini sebagai tanaman hias tetapi juga memiliki kegunaan sebagai tanaman antibakteri.

Biji pinang mengandung alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin yang memiliki sifat sebagai antibakteri (Nony 2013). Alkaloid dapat berfungsi untuk mengganggu terbentuknya jembatan seberang silang komponen penyusun dari peptigoglikan pada sel bakteri yang mengakibatkan dinding bakteri tidak akan terbentuk secara utuh (Azijah 2004). Saponin adalah senyawa glikosida yang dapat

berfungsi untuk menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri. Hal ini mengakibatkan pelisisan pada sel bakteri (Hassan 2008).

Metode fraksinasi adalah cara untuk metode pemisahkan golongan senyawa utama, kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya senyawanya (Mukhriani 2014). Pelarut *n*-heksana dapat melarutkan senyawa yang bersifat nonpolar seperti terpenoid, tripernoid dan sterol, alkaloid, fenil peropanoid (Depkes 1987). Etil asetat adalah pelarut semi polar, mudah menguap dan terbakar. Etil asetat dapat melarutkan senyawa flavonoid, alkaloid dan plifenol (Harbone 1987). Air adalah pelarut yang bersifat polar. Air dapat melarutkan gula, pati, gom, enzim, protein, minyak menguap, lemak peptida, zat pewarna, garam alkaloid, dan asam organik (List & Schamidt 2000). Menurut penelitian dari Puspawati biji pinang mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, dan tanin yang dapat berfungsi sebagai antibakteri.

Penelitian dari Puspawati (2013) menjelaskan bahwa ekstrak biji pinang mempunyai aktivitas antibakteri dengan variasi konsentrasi 1,57%, 3,13%, 6,25% hingga 50%. Konsentrasi 1,57% dianggap sebagai konsentrasi paling efektif untuk menghambat bakteri *S.aureus* dengan konsentrasi 25% paling efektif untuk membunuh bakteri *Pseudomonas aeroginosa.* Penelitian yang dilakukan Nursidika (2014) tentang pengujian fraksi ekstrak etanol biji pinang terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* menunjukan hasil bahwa fraksi fraksi etil asetat, fraksi air dan fraksi *n*-heksana memiliki aktifitas antibakteri dengan ditemukaannya KHM fraksi etil asetat fraksi air dan fraksi *n*-heksana pada bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* sebesar 1.204 µg/ml, 256 µg/ml dan 1.204 µg/ml.

Metode yang digunakan dalam mengukur aktivitas antibakteri adalah metode dilusi dan difusi. Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sehingga dapat diketahui fraksi teraktif dengan konsentrasi terendah yang dapat membunuh bakteri sehingga dilanjutkan dengan metode dilusi. Metode dilusi digunakan untuk mengetahui diameter hambat dari pertumbuhan bakteri fraksi teraktif sehingga dapat lebih diketahui diameter daya hambat pertumbuhan bakteri dari fraksi tersebut.

L. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori, maka dapat ditentukan hipotesis sebagai berikut:

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari biji pinang (*Areca catechu* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

Kedua, fraksi etil asetat merupakan fraksi paling aktif dari ekstrak etanol biji pinang yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

Ketiga, dapat menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

BAB III
METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji pinang (*Areca catechu* L.) yang diperoleh dari wilayah kota Surakarta

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah biji pinang (*Areca catechu* L.) yang diambil pada bulan November 2017 dari populasi secara random kemudian dibuat ekstrak biji pinang. Biji pinang yang diambil adalah biji yang berasal dari buah pinang yang masih muda, berwarna hijau, dan terbebas dari hama.

B. Variabel Penelitian

1. Identivikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah uji aktivitas antibakteri, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari biji pinang (*Areca catechu* L.). Variabel utama kedua adalah *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

2. Klasifikasi variabel utama

Hasil identifikasi dari variabel utama dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel antara lain variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variabel yang dapat diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel kendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya, sehingga hasil yang didapatkan tidak menyebar atau bias dan dapat dilakukan peneliti lain secara tepat. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031, kondisi laboratorium (meliputi: kondisi inkas, alat, dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, waktu panen, pemilihan daun, dan metode ekstraksi.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah berbagai variasi konsentrasi dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fı 25 il asetat, dan fraksi air daun pinang (*Areca catechu* L.).

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 yang dipengaruhi oleh ekstrak fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dari biji pinang (*Areca catechu* L.).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, biji pinang adalah biji dari tanaman pinang (*Areca catechu* L.) yang diambil dari kota Surakarta secara random yang masih berwarna hijau.

Kedua, serbuk daun pinang (*Areca catechu* L.) adalah serbuk yang diperoleh dari biji pinang yang telah dicuci bersih menggunakan air mengalir yang bertujuan agar kotoran yang menempel pada biji dapat hilang, dikeringkan dengan oven suhu 50°C, selanjutnya diblender dan diayak dengan pengayak nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol biji pinang adalah hasil ekstraksi serbuk biji pinang yang dibuat dengan cara mengekstrak serbuk dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.

Keempat, fraksi *n*-heksana biji pinang adalah hasil fraksinasi ekstrak etanol biji pinang dengan pelarut *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat biji pinang adalah hasil fraksinasi dari residu fraksi *n*-heksana ekstrak etanol biji pinang dengan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air biji pinang adalah residu dari hasil fraksinasi ekstrak etil asetat biji pinang dengan pelarut air.

Ketujuh, bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 adalah bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi fakultas Farmasi Uiversitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, aktivitas antibakteri adalah kemampuan suatu senyawa untuk menghambat atau membunuh bakteri.

Kesembilan, metode difusi dengan menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji dari ekstrak etanol fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yaitu dibuat beberapa cakram disk dengan masing-masing fraksi. Kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif adalah ciprofloksasin.

Kesepuluh, metode dilusi dengan menentukan konsentrasi daya bunuh minimum (KBM) yaitu berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%,

0,09%. Kontrol negatif adalah ciprofroksasin dan kontrol positif adalah media BHI ditambah suspensi bakteri.

C. Alat dan Bahan

1. Bahan

Biji pinang adalah dari tanaman pinang (*Areca catechu* L.) yang diambil dari wilayah kota Surakarta. Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 biakan murni, etanol 96%, n-hesana, etil asetat, aquadest steril, xilen, DMSO 1%, HCL, $FeCl_3$, H_2SO_4 pekat, Mg, asam asetat, amil alkohol, reagen Mayer, reagen Dragendroff, $FeCl_3$, NaCl 1% Erlich A, Erlich B, metanol, asam sulfat, asam sulfat anhidrat, asam sulfat glasial, $CHCl_3$, kloroform, *Liberman Bourchat*, Silika gel GF 254, *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mac Conkey Agar* (MCA), *Muller Hinton Agar* (MHA). Media untuk uji biokimia adalah medium *Kligler Iron Agar* (KIA), medium *Lysine Iron Agar* (LIA), medium *Sulfida Indol Motility* (SIM), medium Citrat. Standar *Mc Farland* 0,5,

2. Alat

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

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama yang perlu dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi terhadap tanaman pinang (*Areca catechu* L.) yang dilakukan di bagian Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi ini bertujuan untuk mencocokan ciri makroskopis dan mikroskopis dari tumbuhan pinang (*Areca catechu* L.), selain itu berfungsi juga untuk mencocokan ciri morfologi pada biji pinang (*Areca catechu* L.).

2. Pengeringan bahan dan penyerbukan biji pinang

Tahap kedua dalam penelitian ini adalah pengeringan dan penyerbukan biji pinang (*Areca catechu* L.). Biji pinang yang telah disortasi basah, dicuci bersih pada air mengalir, dipotong tipis-tipis, dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 2-3 hari agar kadar air dalam biji pinang berkurang yang bertujuan untuk mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Simplisia yang telah kering kemudian dihaluskan dengan blender dan diayak dengan menggunakan ayakan no. 40.

3. Penetapan susut pengeringan

Tahap ketiga adalah penetapan susut pengeringan dalam serbuk biji pinang yang dilakukan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Penetapan kadar air serbuk biji pinang dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Serbuk ekstrak ditimbang sebanyak 2 gram, dimasukkan ke dalam alat *moisture balance*. Kemudian *moisture balance* ditutup dan ditunggu hingga terdengar bunyi pada alat sebagai tanda. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat *moisture balance* dicatat sebagai kadar airnya. Kadar air memenuhi standar dimana kadar air suatu sebuk tidak lebih dari 10%.

4. Pembuatan ekstrak secara maserasi

Biji pinang dalam penelitian ini diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan perbandingan simplisia sebanyak 1 bagian dimasukkan ke dalam 10 bagian pelarut. Serbuk biji pinang ditimbang sebanyak 1,2 kg dimasukkan ke dalam botol coklat, kemudian dimasukkan pelarut etanol 96% sebanyak 9 liter. Serbuk biji pinang direndam sambil sesekali dikocok selama 3-4 hari. Maserat dipisahkan dengan cara disaring menggunakan kain flannel dengan bantuan vakum buchner untuk mendapatkan sarinya. Sebanyak 3 liter larutan etanol 96% sisa digunakan untuk pembilasan wadah agar tidak ada yang tertinggal di botol. Maserat kemudian diletakkan diatas evaporator dengan suhu 60 $^{\circ}$C untuk menghilangkan pelarutnya sehingga didapat ekstrak kental.

5. Uji bebas etanol

Ekstrak pekat selanjutnya diuji bebas etanol dengan metode esterifikasi. Uji esterifikasi dilakukan dengan cara 5 tetes ekstrak pekat ditambahkan dengan 5 tetes

asam asetat dan 2 tetes asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Hasil pengujian dinyatakan bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester yang khas (Kurniawati 2015).

6. Penetapan % rendemen

Penetapan % rendeman dari ekstrak biji pinang diperoleh dari hasil ekstrak pekat kemudian ekstrak pekat dibagi dengan berat serbuk biji pinang sebelum di ekstraksi kemudian dikalikan 100%

$$rendemen\ (\%) = \frac{bobot\ ekstrak}{bobot\ sampel} \times 100\%$$

7. Pengujian kandungan Ekstrak Biji Pinang

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.).

7.1 ***Identifikasi alkaloid.*** Ekstrak etanol kental sebanyak ± 0,5 g dilarutkan menggunakan aquadestilata. Kemudian itu ditambahkan dengan 1 ml HCl 2N. Dibuat dalam 2 tabung. Tabung pertama ditambah dengan reagen Mayer terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan. Tabung kedua ditambah dengan reagen Dragendroff terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Alamsyah 2014).

7.2 ***Identifikasi flavonoid.*** Ekstrak etanol kental sebanyak 5 tetes dilarutkan dalam 1-2 ml metanol panas 50% (v/v), kemudian ke dalam larutan ditambahkan serbuk magnesium dan 2 ml larutan alkohol : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran larutan ini dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditandai dengan adanya warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Robinson 1995).

7.3 ***Identifikasi tanin.*** Ekstrak etanol kental + dengan 10 ml aquadest ditambah tiga tetes $FeCl_3$, diamati perubahan warna menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman (Setyowati 2014).

7.4 ***Identifikasi Saponin.*** Identifikasi senyawa saponin dilakukan dengan melarutkan ekstrak pekat biji pinang + aquadestilata, dipanaskan selama 2-3 menit. Setelah dipanaskan tunggu sampai dingin lalu kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil dan setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang menandakan adanya kandungan saponin (Ramyashree *et al.* 2012).

8. Fraksinasi

Fraksinasi dimulai dari ekstrak etanol biji pinang dibuat dengan cara 10 gram ekstrak kental hasil maserasi ditimbang. Ekstrak kental yang telah ditimbang dilarutkan dengan etanol sebanyak 5 ml dan aquadestilata sebanyak 85 ml, kemudian dilakukan pemisahan dalam corong pisah dengan ditambahkan *n*-heksana sebanyak 75 ml, diakukan pengulangan sebanyak tiga kali dengan jumlah *n*-heksana yang sama. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* disebut sebagai fraksi *n*-heksana.

Residu hasil dari fraksinasi *n*-heksana kemudian dipisahkan dalam corong pisah dengan ditambahkan etil asetat sebanyak 75 ml, dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali dengan jumlah etil asetat yang sama. Hasil fraksinasi yang didapkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan kemudian ditimbang dan disebut sebagai fraksi etil asetat.

Terakhir, residu dari fraksi etil asetat dipekatkan dengan cara dibiarkan menguap pada suhu kamar, karena masih terdapat kandungan air yang cukup banyak maka dipekatkan kembali menggunakan waterbath pada suhu ± 50°C kemudian ditimbang dan disebut sebagai fraksi air.

9. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang akan digunakan dalam penelitian harus dalam keadaan steril. Cawan petri, pipet, tabung reaksi, labu elemeyer, beaker glass dan gelas ukur diseterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 170-180^{0}C selama 1-2 jam. Alat yang digunakan untuk penanaman bakteri (ose/sengkelit) diseterilkan menggunakan pembakaran, yaitu dengan cara dibakar di atas lampu spirtus sampai pijar. Media yang digunakan disterilkan menggunakan autokalf pada suhu 121^{0}C selama ± 15-30 menit.

10. Identifikasi bakteri uji

10.1. ***Identifikasi bateri berdasarkan koloni.*** Biakan murni bakteri *Klebsiella pneunomiae* diinokulasikan ke dalam media *Mac Conkey Agar* secara aseptis, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37^{0}C. Diamati jika terbentuk koloni berwarna merah maka hasil posistif. Hasil pengujian kemudian digunakan pada identifikasi bakteri dengan menggunakan metode pewarnaan gram.

10.2. ***Identifikasi bakteri secara pewarnaan Gram.*** Identifikasi bakteri uji *Klebsiella pneunomiae* dengan pewarnaan dilakukan dengan cara meneteskan 1 tetes aquades ke atas kaca obejak, kemudian ditambah dengan 1 ose biakan bakteri lalu difiksasi diatas api. Meneteskan pewarna kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir kemudian tetesi kembali menggunakan lugol diamkan 1 menit dan kembali cuci dengan air mengalir. Alkohol 96% diteteskan ke atas kaca preparat diamkan 0-20 detik dan cuci dengan air mengalir, kemudian tetesi menggunakan safranin diamkan selama 10-20 detik dan cuci dengan air mengalir kembali. Kaca objek dikeringkan kemudian ditambah dengan minyak emersi dan diamati dibawah mikroskop. Hasil dari pewarnaan jika berwarna merah maka bakteri tersebut merupakan gram negatif, tetapi jika berwarna ungu bakteri tersebut merupakan gram positif (Lenni *et.al* 2011)

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

10.3.1. Media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Biakan murni diinokulasi pada permukaan media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif bila media berwarna hitam, uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah dengan reagen Erlich A dan B, uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Pengujian indol dimaksudkan membuktikan hasil hidrolisis triptopan/asam amino yang mengandung cincin indol dengan bantuan enzim triptophanase yang ditandai dengan warna merah. Pengujian bakteri *Klebsiella pneunomiae* berwarna kuning, kuning, kuning dengan penulisan - - -.

10.3.2. Media KIA (*Kliger Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dan sulfida. kemudian diamati pada bagian lereng dasar, terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif

terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+). Pengujian ini bertujuan membuktikan bakteri melakukan farmentasi karbohidrat terutama dalam bentuk gula yang dapat terurai menghasilkan asam saja atau asam dan basa. Pengujian bakteri *Klebsiella pneunomiae* berwarna kuning, kuning dengan penulisan $^{A}/_{AS-}$.

10.3.3. Media LIA (*Lysine Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi dengan inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi bertujuan untuk menguji lisin dan sulfida. Kemudian diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna coklat (ditulis R), berwarna ungu (ditulis K), berwarna kuning (ditulis A), serta terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+). Pengujian bakteri *Klebsiella pneunomiae* berwarna ungu, ungu dengan penulisan $^{K}/_{KS-}$.

10.3.4. Media Citrat. Biakan bakteri diinokulasi dengan metode inokulasi goresan kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru (Jawetz *et al.* 1986). Pengujian citrat bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Jika citrat digunakan sebagai sumber karbon tunggal maka akan melepaskan basa karena sitrar terurai denghasilkan ion OH^- (basa). Pengujian bakteri *Klebsiella pneunomiae* berwarna biru dengan penulisan +.

11. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 dari biakan murni diambil masing-masing sebanyak satu ose kemudian dimasukkan tabung yang berisi 10 ml media BHI (*Brain Heart Infusion*) dan kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi yang didapat kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:1000 dengan menggunakan larutan garam fisiologis yang seharusnya pengenceran menggunakan konsentrasi *Mc Farland* 0,5 pembuatan suspensi ini bakteri bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah sel bakteri (Bonang & Koeswardono 1982).

12. Pengujian aktivitas antibakteri biji pinang

12.1. ***Pengujian antibakteri secara difusi.*** Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri uji. Metode difusi menggunakan cawan petri steril yang telah diisi dengan media MHA dengan volume 30 ml. Secara aseptis pada cawan petri digoresi suspensi bakteri menggunakan kapas lidi steril, kemudian mencelupkan cakram disk kosong ke dalam masing-masing sampel. Kontrol positif adalah ciprofloksasin dan kontrol negatif adalah DMSO 5%. Meletakan cakram disk yang telah dicelupkan ke sampel ke dalam media yang telah diolesi suspensi. Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya, setelah itu diukur diameter zona hambat sekitar sumuran yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar cakram disk menandakan bahwa kandungan kimia biji pinang memiliki daya hambat terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 (Bonang & Koeswardono 1982).

12.2. ***Pengujian antibakteri secara dilusi.*** Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh bakteri uji. Metode dilusi menggunakan 12 tabung steril. Fraksi teraktif dari pengujian difusi diencerkan menggunakan larutan DMSO 5% hingga konsentrasi menjadi 50%, kemudian secara aseptis dari larutan stok tersebut dibuat gradien konsentrasi di bawahnya yaitu kontrol (-); 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,09%, dan kontrol (+). Media BHI dimasukkan 0,5 ml pada tiap tabung kecuali pada tabung no.1. Secara aseptis, masukkan sebanyak 1 ml larutan stok yang akan diuji pada tabung no.1, kemudian pada tabung no.2 dan no.3 dimasuskan sebanyak 0,5 ml larutan stok, kemudian dari tabung no.3 dipipet sebanyak 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung no.4 begitu seterusnya sampai tabung no.11 kemudian dibuang. Ditambahkan sebanyak 0,5 ml biakan bakteri mulai dari tabung no.2 sampai tabung no.12. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, kemudian diamati kekeruhannya. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif untuk masing-masing bakteri uji. Bakteri yang sudah digoreskan pada media selektif diinkubasi dengan suhu kamar 37^{O}C selama 24-48 jam. Diamati ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media

lempeng. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan dengan konsentrasi terendah pada media selektif *Mac Conkey Agar* (MCA) yang tidak menunjukkan adanya koloni bakteri yang tumbuh.

13. Pengujian kandungan senyawa dengan metode KLT

13.1 ***Identifikasi alkaloid.*** Senyawa alkaloid diidentifikasi menggunakan KLT yaitu dengan fase diam yang digunakan adalah silika gel GF_{254} dan fase geraknya yaitu $CHCl_3$: etanol (96 : 4). Kemudian dideteksi menggunakan spektrofotometer UV dengan panjang sinar UV_{254} sehingga akan memberikan warna coklat kehitaman dan UV_{366} berwarna hijau. Pereaksi semprot yang digunakan yaitu dragendorf (Budiman *et al*. 2010).

13.2 ***Identifikasi saponin.*** Identifikasi senyawa saponin menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF_{254} dan fase geraknya yaitu kloroform : metanol : aquades (13:7:2). Kemudian dideteksi menggunakan spektrofotometer UV dengan panjang sinar UV_{254} sehingga akan memberikan warna gelap dan UV_{366} berwarna hijau. Lempeng juga disemprotkan dengan pereaksi LB (*Liberman Bourchat*) dan dipanaskan pada suhu 110°C selama 10 menit untuk memperjelas warna noda yang terbentuk (Suharto *et al*. 2012).

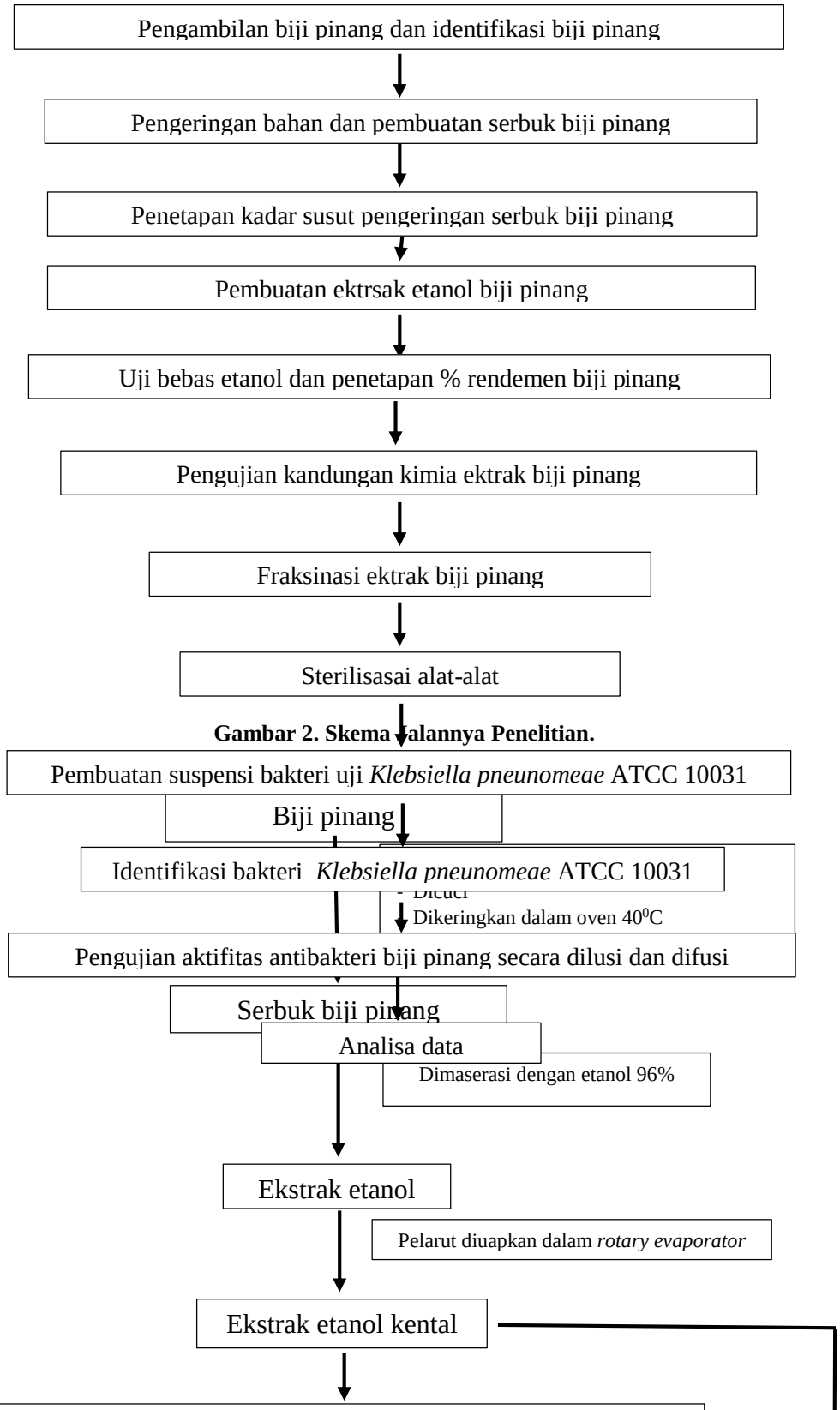
13.3. ***Identifikasi flavonoid.*** Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF_{254} dan fase geraknya yaitu Kloroform : Metanol (2:3). Kemudian dideteksi menggunakan spektrofotometer UV dengan panjang sinar UV_{254} sehingga akan memberikan warna gelap dan UV_{366} berwarna hijau. Lempeng juga disemprotkan dengan pereaksi LB (*Liberman Bourchat*) dan dipanaskan pada suhu 110°C selama 10 menit untuk memperjelas warna noda yang terbentuk (Suharto *et al*. 2012).

13.4. Identifikasi tanin. Identifikasi senyawa tanin menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF_{254} dan fase geraknya yaitu metanol : Aquadest (6:4). Kemudian dideteksi menggunakan spektrofotometer UV dengan panjang sinar UV_{254} sehingga akan memberikan warna gelap dan UV_{366} berwarna hijau. Lempeng juga disemprotkan dengan pereaksi LB (*Liberman Bourchat*) dan dipanaskan pada suhu 110°C selama 10 menit untuk memperjelas warna noda yang terbentuk (Era Puthu *et al*. 2017).

E. Analisa data

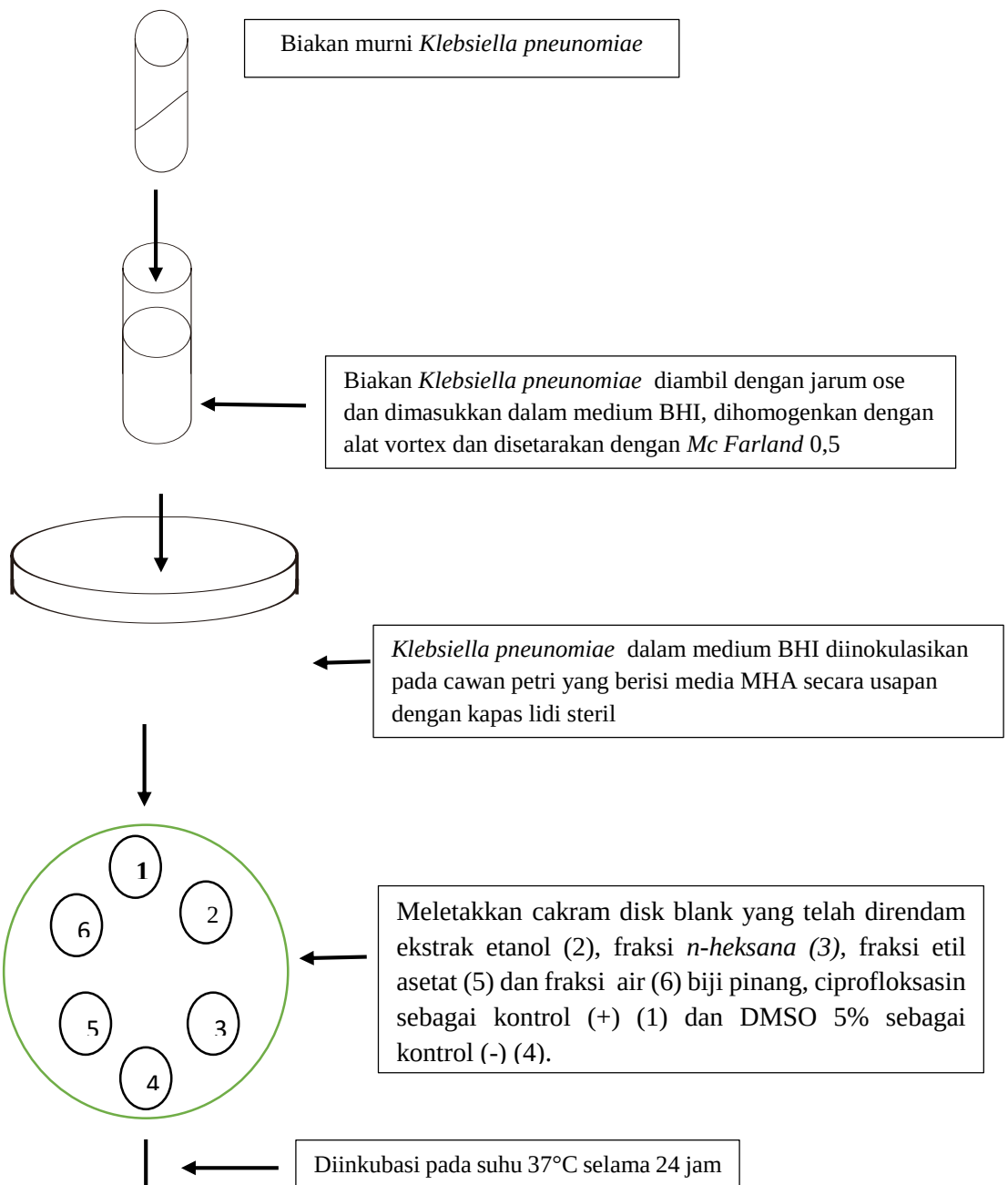
Hasil dari uji aktivitas antibakteri ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* menggunakan metode pengujian difusi didapatkan nilai zona hambat yang terbentuk yang dilakukan pada fraksi teraktif yang di dapat dalam pengujian secara dilusi. Hasil data yang didapatkan dianalisis menggunakan statistika metode Anova Satu Jalan.

F. Skema

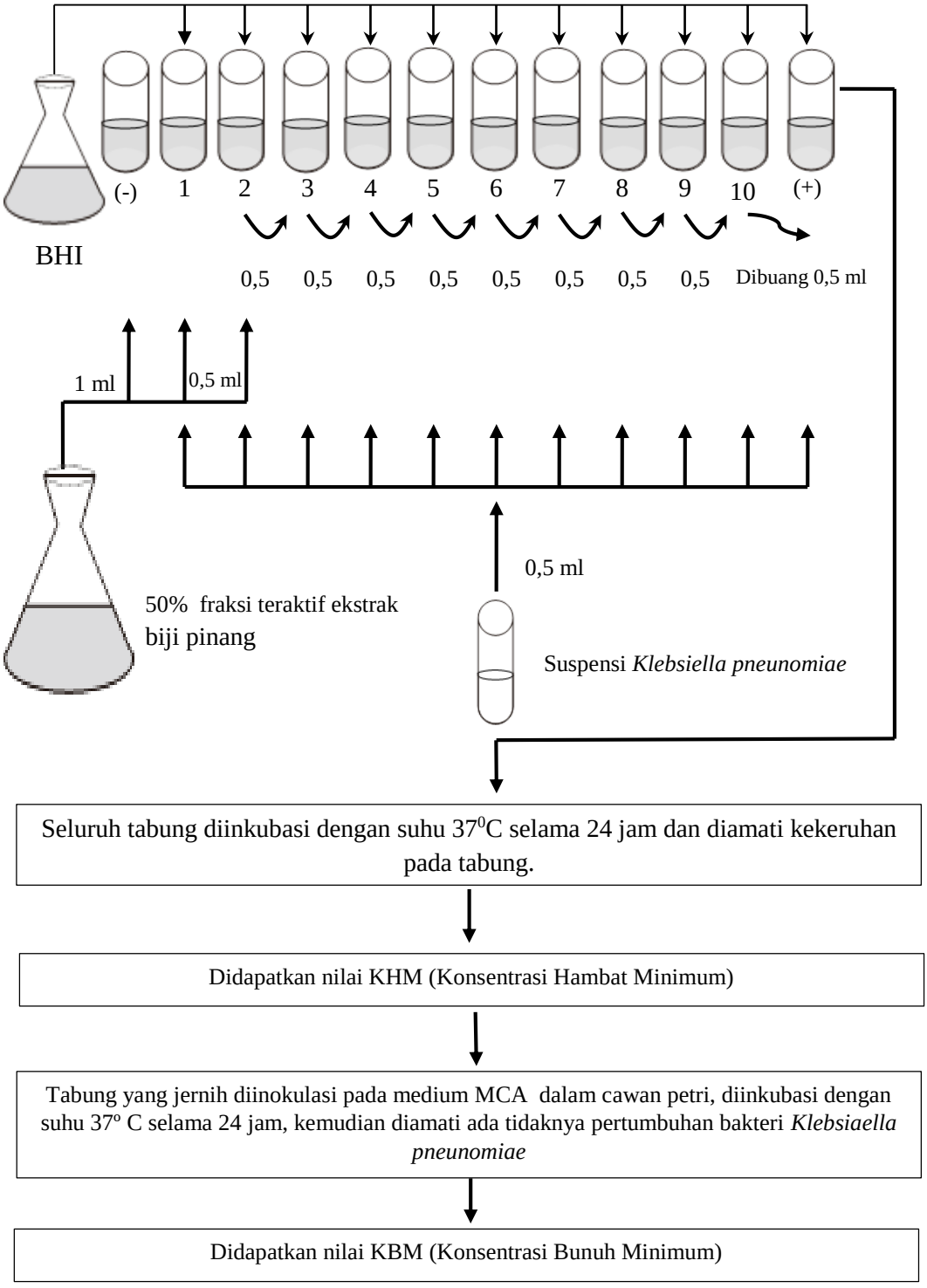


Gambar 2. Skema Jalannya Penelitian.

Gambar 3. Skema Pembuatan ekstrak etanol fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air biji pinang.



Gambar 4. Pengujian secara dilusi ekstrak etanol, fraksi *n-heksana,* etil asetat dan air biji pinang terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.



Gambar 5. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif ektsrak biji pinang terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

BAB IV
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Hasil determinasi biji pinang (*Arecha catechu* L.)

1.1 *Determinasi tanaman.* Tujuan dilakukan determinasi biji pinang adalah untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman pinang terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Hasil determinasi biji pinang berdasarkan Steenis : FLORA 1b-2b-3b-4b-6b-7a-8b. Familia 21. Palmae. 1b-3b-4b-6b-7a-7b-9b.10. Areca. ***Areca catechu* L.**

1.2 *Deskripsi tanaman.* Deskripsi tanaman pinang adalah sebagai berikut : Pohon, sampai tinggi 25m. Tidak bercabang, langsing, besar lk 15 cm, tajuk tidak rimbun. Pelepah daun berbentuk tabung, panjang lk 80 cm; tangkai daun pendek; anak daun 85 cm, lebar lk 5cm, ujung sobek dan begigi. Tongkol bunga dengan seludang (spatha) yang panjang dan mudah rontok, muncul di bawah daun, panjang lk 75 cm, dengan tangkai pendek bercabang rangkap, sumbu ujung sampai panjang 35 cm, dengan 1 bunga betina pada pangkal, diatanya dengan banyak bunga jantan tersusun dalam 2 baris yang tertancap dalam alur. Bunga jantan panjang 4 mm, putih kuning, benang sari 6. Bunga betina panjang lk 1,5 cm, hijau, bakal buah beruang 1. Buni, bulat telur terbalik memanjang, merah oranye, panjang lk 6 cm, dinding buah beserabut. Satu, berbentuk bulat telur, ada gambaran seperti jala.

Berdasarkan hasil determinasi dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman pinang (*Areca catechu* L.). Gambar dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Hasil pengumpulan bahan, pengeringan, dan pembuatan serbuk biji pinang

Biji pinang diambil secara acak dari daerah Mojosongo, kota Surakarta pada bulan November 2017 dengan kriteria buah pinang yang masih berwarna hijau dan yang masih segar. Biji pinang yang telah dikumpulkan dibersihkan, dicuci lalu dikupas untuk diambil bijinya dan dikeringkan. Tujuan dari pengeringan bahan adalah mengurangi kadar air mencegah tumbuhnya jamur dan

mikroorganisme lain yang dapat menyebabkan pembusukan dan menimbulkan perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada tabel 1. Biji pinang sebanyak 5500 gram bobot basah kemudian dikeringkan dan didapat bobot kering sebanyak 19670 gram**,** diperoleh rendemen bobot kering terhadap bobot basah adalah 35,81%. Perhitungan persentase bobot basah terhadap bobot kering dapat dilihat pada lampiran 13.

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah biji pinang.

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (% b/b)
5500	1970	35,81

3. Hasil penetapan kadar lembab serbuk biji pinang

Penetapan kadar lembab serbuk biji pinang (*Areca catechu* L.) menggunakan alat *Moisture Balance*. Hasil penetapannya tercantum pada tabel di bawah ini:

Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab biji pinang.

No	BOBOT SERBUK (GRAM)	KADAR LEMBAB (%)
1	2,04	6,7
2	2,09	5,5
3	2,05	7,1
	Rata-rata	6,4 ± 0,833

Hasil penetapan kadar lembab biji pinang didapatkan rata-rata sebesar 6,4%. Kadar lembab tersebut dinyatakan memenuhi syarat dimana kadar lembab serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10% karena dengan kadar lembab kurang dari 10% maka sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tidak tumbuh sehingga bahan lebih awet (Katno *et al* 2008).

4. Hasil pembuatan ekstrak biji pinang

Pembuatan ekstrak etanol pada penelitian ini menggunakan metode maserasi, metode maserasi adalah metode penyarian yang paling sederhana yaitu dengan cara merendam serbuk menggunakan pelarut yang sesuai dalam waktu tertentu. Keuntungan metode maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Metode maserasi tidak memerlukan pemanasan sehingga kandungan kimia yang tidak tahan panas seperti flavonoid tetap ada di dalam ekstrak dan senyawa yang terkandung tidak mengalami kerusakan. Hasil pembuatan ekstrak kental maserasi biji pinang dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi biji pinang.

Berat serbuk (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen (%)
1200	562,647	46,8%

Hasil rendemen ekstrak maserasi biji pinang yang diperoleh sebesar 46,8% dan hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 14.

5. Hasil pengujian bebas etanol

Hasil pengujian bebas etanol ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengujian bebas etanol.

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

Hasil pengujian bebas etanol ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) menunjukan bebas etanol yang ditunjukan tidak terciumnya bau ester yang khas. Tujuan dari pengujian bebas etanol ini pada ekstrak biji pinang adalah untuk mencegah kesalahan pada pengamatan/terpengaruhnya hasil dalam tahap penelitian selanjutnya yaitu pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 sebab etanol memiliki aktivitas untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian. Hasil pengujian bebas etanol terdapat pada lampiran 6.

6. Hasil uji kandungan kimia ekstrak etanol biji pinang

Berdasarkan tabel 5, hasil identifikasi senyawa kimia yang telah dilakukan pada ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) menunjukan bahwa ekstrak mengandung alkaloid, tanin, flavonoid, dan saponin yang diperkirakan memiliki aktivitas antibakteri. Identifikasi kandungan kimia terhadap ekstrak biji pinang dengan menggunakan metode tabung. Senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, dan saponin memiliki mekanisme aktivitas antibakteri yang berbeda-beda. Gambar hasil pengujian kandungan senyawa biji pinang (*Areca catechu* L.) pada lampiran 6.

Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol biji pinang dapat dilihat pada tabel 5. Ekstrak etanol biji pinang positif senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin.

Tabel 5. Hasil uji kandungan kimia ekstrak etanol biji pinang.

Senyawa	Hasil	Pustaka	Ket
Alkaloid	Tabung 1 → endapan putih kekuningan Tabung 2 → merah hingga jingga	Tabung pertama ditambah dengan reagen Mayer terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan. Tabung kedua ditambah dengan reagen Dragendroff terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Alamsyah 2014).	+
Tanin	Terbentuk endapan hijau kehitaman.	Hasil positif terjadi perubahan warna menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman (Setyowati 2014).	+
Flavonoid	Adanya warna merah pada lapisan amil alkohol	Reaksi positif ditandai dengan adanya warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Robinson 1995).	+
Saponin	Terbentuk busa yang stabil setla di tambah HCl 2N	Adanya busa yang stabil dan setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang menandakan adanya kandungan saponin (Ramyashree *et al*. 2012).	+

+ : mengandung senyawa

7. Hasil fraksinasi ekstrak biji pinang

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama, kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawanya yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Penyarian secara fraksinasi adalah proses pemisahan senyawa yang terkandung dalam ektrak hasil penyarian biasa akan terpisah menurut kepolarannya. Senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan tertarik dalam pelarut *n*-heksana, senyawa semi polar akan tertarik ke pelarut etil asetat dan senyawa yang bersifat polar akan tertarik dalam pelarut air. Senyawa yang telah terpisahkan sesuai dengan kepolarannya akan lebih mudah diperkirakan yang dapat digunakan sebagai antibakteri (Mukhriani 2014; Tiwari *et al*. 2011). Rendemen hasil fraksinasi dapat dilihat di tabel 6.

Tabel 6. Hasil fraksinasi ekstrak biji pinang.

Pelarut	Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%b/b)
n-heksana	115	1,35	1,17
Etil asetat	115	6,85	5,95
Air	115	20,89	18,17

Menurut tabel 6 fraksi air merupakan fraksi dengan jumlah terbanyak karena senyawa yang terkandung dalam biji pinang sebagian besar bersifat polar. Banyak bobot fraksi dipengaruhi oleh kemampuan masing-masing pelarut untuk dapat menyaring senyawa yang terkandung di dalam ekstrak. Presentase rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air masing masing 1,17%, 5,95% dan 18,17%. Rendemen fraksi yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu 100%, hal itu dapat disebabkan karena banyak ekstrak yang menempel pada wadah dan corong pisah dan kurangnya kekentalan ekstrak untuk proses fraksinasi. Terbentuk emulsi pada saat proses fraksinasi menggunakan pelaruh *n*-heksana yang tidak dapat digunakan. Hasil fraksinasi yang mengalami emulsi seharusnya tetap di timbang tetapi dalam penelitian ini telah dibuang sehingga nilai rendemen yang didapatkan menjadi kecil. Hasil perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 15.

8. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 yang berasal dari biakan murni diambil sebanyak satu ose dan kemudian dimasukkan ke tabung yang telah diisi 10 mL media BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi yang didapat diencerkan dengan perbandingan 1:1000 dengan menggunakan media BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian disetarakan menggukanan konsentrasi *Mc Farland* 0,5 pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah sel bakteri.

9. Hasil identifikasi bakteri uji

9.1. Identifikasi bakteri secara goresan. Identifikasi bakteri uji *Klebsiela pneunomiae* ATCC 10031, dilakukan menggunakan biakan murni *Klebsiella pneunomiae* diinokulasi pada media selektif *Mac Conkey Agar* (MCA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil goresan positif akan memiliki bentuk koloni yang besar-besar, smooth dan cembung. Hasil dari pengujian goresan bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 dapat dilihat pada lampiran 7 gambar 15.

9.2. Identifikasi bakteri uji secara pewarnaan gram. Identifikasi bakteri uji *Klebsiela pneunomiae* ATCC 10031, dilakukan menggunakan hasil pengujian secara goresan yang diambil sebanyak 1 ose dan diletakkan pada 1 tetes aquades pada kaca objek. Ditambah pewarna kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit,

dicuci dengan air mengalir kemudian ditetes kembali menggunakan lugol didiamkan selama 1 menit dan kembali dicuci dengan air mengalir. Alkohol 96% diteteskan ke atas kaca preparat diamkan 0-20 detik dan dicuci dengan air mengalir, kemudian ditetesi menggunakan safranin didiamkan selama 10-20 detik dan dicuci dengan air mengalir kembali. Kaca objek dikeringkan kemudian ditambah dengan minyak emersi dan diamati dibawah mikroskop. Hasil pengujian dibawah mikroskop berwarna merah yang menandakan sebagai gram negatif. Hasil dari pengujian pewarnaan bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 dapat dilihat pada lampiran 7 gambar 15.

9.3. Identifikasi bakteri uji secara biokimia. Uji biokimia bakteri merupakan salah satu cara untuk mengidentifikasi suatu biakan murni hasil isolasi bedasarkan sifat-sifat fisiologinya. Pengujian ini menggunakan media SIM, KIA, LIA dan Citrat dengan cara menginokulasikan bakteri kedalam media dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37º C. Hasil biokimia dapat dilihat di tabel 7 dan gambar dapat dilihat di lampiran 7

Tabel 7. Tabel hasil uji biokima

Pengujian	Warna media	Hasil	Pustaka
SIM	Kuning, kuning tidak ada warna hitam	---	---
KIA	Kuning, kuning tidak ada warna hitam	**A/AS -**	**A/AS -**
LIA	Ungu, ungu tidak ada warna hitam	**K/KS -**	**K/KS-**
Citrat	Biru	+	+

Keterangan :

SIM : *Sulfida Indol Agar*
KIA : *Kliger Iron Agar*
LIA : *Lysine Iron Agar*

K : Merah (pada media KIA)
A : Terbentuk warna kuning
K : Terbentuk warna ungu (pada media LIA)
S(-) : Tidak terbentuk warna hitam

Medium SIM (*Sulfida Indol Motility*) digunakan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas. Pada pengujian SIM menunjukan bahwa hasil negatif (-) artinya *Klebsiella pneunomiae* tidak dapat mereduksi thiosulfate sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide sehingga tidak berwarna hitam, hasil indol negatif (-) setelah ditambah tiga tetes reagen erlich A dan erlich B tidak tidak terbentuk warna merah muda di permukaannya yang berarti bakteri *Klebsiella pneunomiae* tidak membentuk indol dari tryptopan sebagai sumber karbon.

Pengujian motilitas negatif yang berarti tidak ada pergerakan bakteri karena pertumbuhan bakteri hanya terdapat dibekas tusukan.

Pada medium KIA (*Klinger's Iron Agar*) digunakan untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Hasil yang diperoleh dari bakteri *Klebsiella pneunomiae* adalah A/AS- yang berarti lereng dan dasar media berwana kuning yang menunjukan terjadinya fermentasi glukosa dan laktosa. Sulfida negatif dengan tidak adanya warna hitam pada media yang dikarenakan tidak memproduksi hidrogen sulfida. Medium KIA (*Klinger's Iron Agar)* mengandung 1% laktosa, glukosa 0,1%, dan indikator phenol red. Perubahan warna media dari merah menjadi kuning disebebkan karena aktivitas fermentasi bakteri yang mengubah pH media menjadi asam yang dimana indikator *phenol red* (dalam suasana basa).

Medium LIA (*Lysin Iron Agar)* digunakan untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida dari bakteri *Klebsiella pneunomiae.* Hasil dari pengujian ini yaitu K/KS- artinya bagian lereng dan dasar media terbentuk warna ungu yang menunjukan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin dan tidak mendekarbosilasi lisin. S- berarti uji H_2S negatif yang ditunjukan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media.

Medium Citrat digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri *Klebsiela pneunomiae* untuk menggunakan citrat sabagai karbon tunggal. Hasil pengujian citrat adalah media berubah menjadi biru yang berarti positif yang berarti bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal (WHO 2003).

10. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air biji pinang terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* dilakukan dengan metode difusi untuk mengetahui diameter hambat yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan larutan uji terhadap pertumbuhan bakteri *klebsiella pneunomiae,* ditunjukan dengan terbentuk atau tidaknya daerah jernih disekeliling cakram (disk blank) pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). *Mueller Hinton Agar* (MHA) adalah media pertumbuhan bakteri yang diperkaya, sehingga bakteri dapat

tumbuh dengan optimal. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi paling aktif yang memiliki daya hambat terbaik pada bakteri *Klebsiella pneunomiae.*

Pengujian aktivitas sediaan dari ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari biji pinang pada bakteri *Klebsiella pneunomiae* menggunakan konsentrasi masing-masing 50%, 25%, 12%, Ciprofloksasin sebagai kontrol positif dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Pengenceran sediaan menggunakan DMSO 5%, DMSO dipilih karena dapat mensuspensikan zat aktif dalam ekstrak, aman, dan tidak toksik. Perhitungan konsentrasi sediaan dapat dilihat di lampiran 16. Hasil uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dapat dilihat pada tabel 8. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat di lampiran 8,9, dan 10.

Tabel 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi.

NO	Perlakuan	Diameter (mm) Pengulangan			Rata-rata ± SD
		I	II	III	
1	*n*-heksana 50%	4	5	6	$5{,}00^{a} \pm 1{,}00$
2	*n*-heksana 25%	8	3	4	$5{,}00^{a} \pm 2{,}65$
3	*n*-heksana 12,5%	9	2	3	$4{,}67^{a} \pm 3{,}79$
4	Etil asetat 50%	18	19	17	$18{,}00^{c} \pm 1{,}00$
5	Etil asetat 25%	25	26	22	$24{,}33^{d} \pm 2{,}08$
6	Etil asetat 12,5%	20	24	24	$22{,}67^{d} \pm 2{,}31$
7	Air 50%	17	16	17	$16{,}67^{b} \pm 0{,}58$
8	Air 25%	17	19	15	$17{,}00^{c} \pm 2{,}00$
9	Air 12,5%	18	12	15	$15{,}00^{b} \pm 3{,}00$
10	Ekstrak 50%	16	15	15	$15{,}33^{b} \pm 0{,}58$
11	Ekstrak 25%	20	17	16	$17{,}67^{c} \pm 2{,}08$
12	Ekstrak 12,5%	15	15	15	$15{,}00^{b} \pm 0{,}00$
13	Ciprofloksasin	30	31	32	$31{,}00^{e} \pm 1{,}00$
14	DMSO 5%	0	0	0	$0{,}00^{a} \pm 0{,}00$

^{abcde} : ada perbedaan yang signifikan dengan sig > 0,005

Diameter hambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneunomiae* ditunjukan dengan adanya area bening disekitar cakram disk pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri antara lain kandungan senyawa antibakteri, jenis bakteri, daya difusi ekstrak dan konsentrasi ekstrak. Menurut Davis dan Stout (1971) kekuatan antibakteri dikelompokkan menjadi sangat kuat (zona hambat > 20 mm), kuat (zona hambat 10-20 mm), sedang (zona hambat 5-10 mm) dan lemah (zona hambat < 5mm). Hasil pengujian diameter hambat fraksi *n*-heksana pada konsentrasi 50% (5,0 mm), 25% (5,0 mm) termasuk kelompok sedang dan pada konsentrasi 12,5% (4,67 mm) termasuk dalam

kelompok lemah. Diameter hambat fraksi etil asetat pada konsentrasi 50% (18,00 mm) termasuk dalam kelompok kuat dan pada konsentrasi 25% (24,33 mm), 12,5% (22,67) termasuk dalam kelompok sangat kuat. Diameter hambat fraksi air pada konsetrasi 50% (16,67 mm), 25% (17 mm), dan 15,5% (15 mm) termasuk dalam kelompok kuat. Diameter hambat ektrak pada konsentrasi 50% (15,33 mm), 25% (16,67 mm), dan 12,5% (15 mm) termasuk dalam kelompok kuat. Menurut hasil diameter daya hambat, diketahui bahwa fraksi etil asetat dengan konsentrasi 25% merupakan fraksi dan konsentrasi paling efektif dalam menghambat bakteri *Klebsiella pneunomiae*. Konsentrasi tersebut memiliki daya hambat terbesar dibanding fraksi yang lain dan ekstrak, untuk memastikan bahwa fraksi etil asetat adalah fraksi teraktif maka dilanjutkan dengan uji analisa data. Pada umumnya, peningkatan diameter zona hambat berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi fraksi. Tetapi terjadi penurunan diameter zona hambat pada beberapa konsentrasi yang lebih besar yang ditunjukkan konsentrasi 25% lebih besar dibanding dengan konsentrasi 50%, yang menyebabkan peningkatan diameter zona hambat tidak berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi disebabkan karena kepekatan fraksi yang berpengaruh terhadap kecepatan dan kemampuan difusi dari senyawa antibakteri ke dalam media agar pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan tabel 8 dan analisa data maka disimpulkan bakwa fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dibandingan dengan fraksi *n*-heksana, fraksi air dan ekstrak etanol biji pinang dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneunomiae*. Ekstrak etanol memiliki aktivitas antibakteri yang kurang baik, walaupun semua senyawa yang terkandung dalam biji pinang dapat tertarik kedalam ekstrak etanol tetapi senyawa-senyawa tersebut tidak dapat bekerja secara sinergis sehingga menghasilkan daya hambat yang kurang baik. Fraksi *n*-heksana dan fraksi air dapat menarik senyawa-senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri yang belum bisa bekerja secara optimum sehingga daya hambat terhadap bakteri masih rendah. Fraksi etil asetat memiliki daya hambat terbesar terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae*, adanya kemungkinan fraksi etil asetat dapat menarik senyawa-senyawa paling aktif dalam aktivitas antibakteri dibanding dengan fraksi yang lain. Senyawa aktif dalam fraksi etil asetat adalah tanin, flavonoid, dan saponin. Hal ini berhubungan dengan sifat kepolaran senyawa tersebut sehingga dapat tertarik ke fraksi etil asetat.

Aktivitas penghambatan *Klabsiella pneunomiae* oleh fraksi etil asetat disebebkan pengaruh senyawa bioaktif atau metabolit sekunder yang terdapat dalam fraksi. Flavonoid memiliki aktivitas antibakteri dengan cara mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler bakteri sehingga merusak membran bakteri yang menyebabkan lisis (Dewanti & Wahyudi 2011). Senyawa saponin dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri. Hal ini mengakibatkan pelisisan pada sel bakteri, sehingga sel baketri mudah bocor dan mengalami lisis (Hassan 2008). Senyawa tanin mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasi protein, yaitu melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Dewanti & Wahyudi 2011).

Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5%, yang merupakan pelarut yang digunakan dalam pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan air. Menurut hasil percobaan DMSO 5% tidak memiliki daya hambat terhadap aktivitas bakteri yang ditunjukan tidak terbentuknya zona bening disekitar DMSO 5%. Hal ini menunjukan bahwa diameter hambat yang terbentuk benar-benar merupakan aktivitas dari masing-masing fraksi dan ekstrak etanol biji pinang.

11. Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi

Pegujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif yaitu fraksi etil asetat dari ekstrak biji pinang menggunakan metode dilusi yang bertujuan untuk mendapatkan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae.* Kontrasi sediaan yang digunakan dalam metode dilusi adalah 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, dan 0,09%. Kontrol negatif yang digunakan adalah fraksi etil asetat sedangkan kontrol positif menggunakan media BHI yang ditambah suspensi bakteri. Jumlah bakteri *Klebsiella pneunomiae* yang digunakan disetarakan terlebih dahulu dengan standart *Mc Farlan* 0,5 dalam medium BHI yang memiliki perbandingan 1: 1000 kemudian ditambahkan dengan fraksi etil asetat.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilihat dari kejernihan tabung yang menunjukkan bahwa pada tabung konsentrasi konsentrasi dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 tidak dapat dilihat kejernihannya karena

tertutupi oleh kekeruhan dari fraksi yang berwarna coklat. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menunjukkan adanya daya antibakteri fraksi yang dapat dilihat dari pengujian fraksi terhadap bakteri uji pada tabung kemudian diinokulasikan pada media selektif *Mac Conkey Agar* (MCA) dengan tidak atau adanya pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 pada media *Mac Conkey Agar* (MCA).

Tabel 9. Hasil pengujian fraksi etil asetat secara dilusi

No	konsentrasi (%b/v)	Etil Asetat		
		I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	50	-	-	-
3	25	-	-	-
4	12,5	-	-	-
5	6,25	-	-	-
6	3,125	±	±	±
7	1,563	±	±	±
8	0,781	±	±	±
9	0,391	±	±	±
10	0,195	±	±	±
11	0,098	±	±	±
12	Kontrol(+)	±	±	±

Hasil pengujian pada tabel 9 menunjukan bahwa KHM sulit diamati karena kekeruhan dari fraksi sehingga perlu dilakukan penggoresan pada media MCA untuk mengetahui KBM frraksi. KBM dari fraksi etil asetat didapat pada konsentrasi 6,25% yang ditunjukan tidak adanya koloni yang tumbuh pada media MCA. Semakin tinggi konsentrasi dari sediaan maka kandungan kimia dalam sediaan akan semakin tinggi sehingga aktivitas antibakteri akan semakin baik juga. Sediaan uji yang memiliki KBM dengan konsentrasi semakin kecil maka semakin potensial sediian tersebut sebagai antibakteri karena dalam konsentrasi kecil sediaan uji sudah dapat membunuh bakteri. Hasil pengujian secara dilusi dapat dilihat pada lampiran 11 dan 12.

KHM merupakan konsentrasi terendah dari fraksi etil asetat yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri uji. Nilai dari KHM berbanding terbalik dengan nilai sensitivitas bakteri, semakin kecil nilai KMH maka sensitivitasnya semakin tinggi. KBM dalam penelitian ini dapat diketahui melalui ada tidaknya

pertumbuhan bakteri yang digoresan pada media MCA. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa perbandingan konsentrasi fraksi etil asetat sebagai fraksi teraktif belum mampu mengalahkan obat sintetik yaitu ciprofloksasin.

12. Hasil identifikasi fraksi paling aktif secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi terhadap kandungan kimia dengan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) hanya dilakukan pada fraksi etil asetat karena fraksi ini mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031. Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui beberapa senyawa antibakteri yang terkandung pada fraksi etil asetat dapat dilihat di tabel 10 dan gambar lempeng hasil pengujian dapat dilihat pada Lampiran 12.

Tabel 10. Hasil pengujian KLT

Senyawa	F.Gerak	Pereaksi Semprot	Hasil Sesudah Disemprot		Nilai Rf		Ket
			UV 254	UV 366	Sampel	Baku	
Flavonoid	Kloroform: Metanol (2:3)	Sitoborat	Peredaman	Berwarna ungu gelap	0,86	0,84	+
Saponin	Klorofom :metanol:aquades (13:7:2)	LB (*Liberman Bourchat)*	Berwarna gelap	Berwana hijau	0,85	0,86	+
Tanin	Metanol:aquades (6:4)	$FeCl_3$ 5%	Berwarna hitam	Berwarna hitam	0,88	*	+
Alkaloid	$CHCl_3$: Etanol (94 : 4)	Dragendrof	Coklat kehitaman	Hijau	0,24	0,85	-

***: tidak menggunakan pembanding**
- : tidak mengandung senyawa
+ : mengandung senyawa

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa flavonoid pada UV_{254} memberikan peredaman dan berwarna ungu gelap pada UV_{366}. Nilai Rf bercak adalah 0,86 yang hampir sama dengan pembanding rutin dengan nilai Rf 0,84. Senyawa flavonoid akan terlihat bercak yang berflouresensi biru, kuning, ungu gelap (Harborne 1987), sehingga bisa disimpulkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol biji pinang positif mengandung flavonoid dari bercak pada lempeng KLT yang dilihat pada UV_{254}, UV_{366}, pereaksi semprot dan nilai Rf yang hampir sama dengan pembanding rutin..

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa saponin pada UV_{254} berwarna gelap dan berwarna hijau pada UV_{366}. Nilai Rf bercak adalah 0,85 yang hampir sama dengan pembanding saponin dengan nilai Rf 0,86. Senyawa saponin akan terlihat bercak yang berflouresensi hijau gelap (Harborne 1987), sehingga bisa disimpulkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol biji pinang positif mengandung flavonoid dari bercak pada lempeng KLT yang dilihat pada UV_{254}, UV_{366}, pereaksi semprot dan nilai Rf yang hampir sama dengan pembanding saponin.

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa tanin pada UV_{254} memberikan warna kehitaman dan berwarna hitan pada UV_{366}. Setelah lempeng disemprot dengan pereaksi $FeCl_3$ 5% terdapat bercak berwarna kehitaman yang dapat dilihat secara langsung. Bercak berwarna jingga ini menandakan adanya senyawa golongan saponin pada biji pinang (Budiman *et al*. 2010). Harga Rf yang didapatkan setelah dihitung adalah 0,88.

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa alkaloid pada UV_{254} memberikan coklat kehitaman dan berwarna hijau pada UV_{366}. Nilai Rf bercak adalah 0,24 yang hampir sama dengan pembanding rutin dengan nilai Rf 0,85. Senyawa flavonoid akan terlihat bercak yang berflouresensi biru, kuning, ungu gelap (Harborne 1987), sehingga bisa disimpulkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol biji pinang negatif mengandung flavonoid dari bercak pada lempeng KLT yang dilihat pada UV_{254}, UV_{366}, pereaksi semprot dan nilai Rf yang jauh sama dengan pembanding rutin.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan fraksi air dari biji pinang (*Areca catechu* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

Kedua, fraksi etil asetat dari ekstrak etanol biji pinang merupakan fraksi yang paling aktif sebagai antibakteri terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat dari biji pinang (*Areca catecu* L.) sebagai fraksi teraktif terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 adalah 6,25%.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut biji pinang (*Areca catecu* L.) sebagai antibakteri pada bakteri gram negatif yang lain selain *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat ekstrak biji pinang yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031.

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

Keempat, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* terhadap fraksi etil asetat dari ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.).

DAFTAR PUSTAKA

Alamsyah HK, Widowati I, Sabdono A. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *Sargassum cinereum* (J.G. Agardh) dari perairan pulau panjang jepara terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermidis*. *Journal Of Marine Research* 3:69-78.

Ambika K, Rajagopal B. 2014. Antimicrobial and Phytochemical properties of *Areca catechu* L leaf and Root Extracts. *International journal of cerrent research in biosciences and plant biology* halaman 107-112.

Azijah A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap ekstrak daun *Psidium Guajava* L. *Bioscientiae* 2:31-38.

Balitbang Kemenkes Republik Indonesia. 2013. Riset Kesehatan Dasar: *Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI.

Bonang G dan Koeswardono.1982. *Mikrobiologi Untuk Laboratorium dan Klinik.* Jakarta: PT Gramedia. hlm 77-78, 176-191.

Budiman H, Rahmawati F, Sanjaya F. 2010. Isolasi dan identifikasi alkoloid pada biji kopi robusta *(Coffea robusta Lindl.* Ex De Will*)* dengan cara kromatografi lapis tipis. *CERATA Jurnal Ilmu Farmasi (Journal of Pharmacy Science)* 1:57-58.

Chin A, *et al*. 2013. Antimicrobial Performance of Ethanolic Extract of *Areca catechu* L Seeds Against Mixed-Oral Flora from Tooth Scum and Gram Negarive Laboratory Isolates. *International journal research Ayurveda Pharm* halaman 876-880.

Dalimartha S. 2008. *1001 Resep Herbal*. Jakarta: Penebar Swadaya hlm 11-12.

Deinstrop dan Elke. 2007. *Applied Thin-Layer Chromatography*. 2nd ed.Weinheim: Wiley-VCA. hlm 1-2.

[Depkes RI] Departemen Kesehaan Republik Indonesia. 1985. *Pembuatan simplisia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

[Depkes RI] Departemen Kesehaan Republik Indonesia. 1986. *Sediaan Galenik. Jakarta* : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm. 4-11.

[Depkes RI] Departemen Kesehaan Republik Indonesia. 1987. *Analisis Obat Tradisional*. Jilid I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

[Depkes RI] Departemen Kesehaan Republik Indonesia. 1989. *Matreria Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Dianasari N. 2009. Uji aktivitas ekstrak etanol kayu secang *(Caesalpinia sappan* L.*)* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysentri serta* bioautografi [skripsi]. Surakarta : Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Dewanti S dan Wahyudi MT. 2011. Antibacterial activity of bay leaf infuse (*Folia Syzygium polyanthum* Wight) to *Escherchia coli* in-vitro. Surabaya: *Jurnal Medika Planta* 1:78-81.

Entjang I. 2003. *Mikrobiologi dan Parasitologi untuk Akademi Keperawatan.* Bandung: PT citra aditya bakti.

Fatimah. 2010. Identifikasi bakteri *Klebsiella. http:/www.google.com/identifikasi-bakteri klebsiella/*. [Juli 2017].

Goodman & Gilman. 2010. *Dasar Farmakologi Terapi*. editor Joel G, Hardman, Lee E. Limbird. Jakarta, EGC. Terjemahan dari *Pharmacological Basis of Therapeutic.*

Gunawan D dan Muyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam*. Jilid 1. Jakarta : Penebar Swadaya, hlm 9-13.

Hadioetomo RS. 1985. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium.* Jakarta: Gramedia. Hlm 42-44.

Hanani E. 2014. *Analisis Fitokimia.* Jakarta : Buku Kedokteraran EGC. Halaman 11-13, 103-104, 133-134, 79-80.

Harbone JB. 1987. *Metode Fitokimia. ED II*. Penerjemah :Kosasi Patmawinata dan iwang sudiro. Bandung : ITB. Terjamahan dari *Phitochemical Method.*

Hassan, Mohammed S. 2008. Antimicrobyal Activity of saponnin-rich *Guar meal* extrak. *Texas A&M University* halaman 345-355.

Hilmi A, Sudjarwo, Darmawati A. 2013. Validasi metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri untuk penetapan kadar kolkisin dalam infus daun kembang sungsang *(Gloriosa superba* Linn.*). Berkala Ilmiah Kimia Farmasi* 2:1-8.

Jawetz E, Melnick J.L, Adelberg E.A. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerjemah: Mudihardi. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*

Karadi R, Arpan S, Pranav P, Parvez A. 2011. Antimicrobial activities of *Musa paradisiacal* and *Cocos nucifera*. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2 (1) 264-265.

Katzug, B.G.2007. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Ed ke-5. Dripa S, penerjemah: Jakarta: EGC Terjemahan dari: *Basic and Clinical Pharmacology*. Hlm 779-787,857

[Kemenkes RI] Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.2013. Farmakope Indonesia edisi V. Jakarta : Kementrian Kesehatan RI. Halaman: 1661-1667.

Kisra K. Relationships among Capsular Structure, Phagocytosis, and Mouse Virulence in Klebsiella pneumoniae. *Infection and Immunity* 1995;3: 847-52.

Kumala S, Siswanto EB.2007. Isolation and screening of endophytic from *Morinda citrifolia* and their ability to produce anti-microbial substance. *Microbiology Indonesia 1*(3): 145-148

Kurniawati E. 2015. Daya antibakteri ekstrak etanol tunas bambu apus terhadap bakteri *Escherichia coli dan Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Jurnal Wiyata* 2: 83-90.

List PH, schmidt PC. 2000. *Phytopharmaceuticals Technology*. David E, penerjemah; Florida : CRC Press. Hal 67.71. 107-111. Terjemahan dari *Phytopharmaceuticals technology*.

Lenni F, Yekki Y. 2011. Isolasi dan Pengamatan Morfologi Koloni bakteri *Kinolitik*.[Skripsi]. Banda Aceh*:* Fakultas MIPA. Unisyah.

Marliana SD, Suryanti V, Suyono. 2005. Skrining fitokimia dan analisis Kromatografi Lapis Tipis komponen kimia buah labu siam *(Sechium edule* Jacq. Swartz*.)* dalam ekstrak etanol. *Biofarmasi 3*:26-31.

Martindale. 1993. *The Pharmacopedia*. Edisi 23. James EF, Rynold, editor. London : The Pharmaceutical press.

Misnadiarly, 2008, *Penyakit Infeksi Napas Pneumonia pada Anak, Orang Dewasa, Usia Lanjut, Pneumonia Atipik & Pneumonia Atypik Mycobacterium*, Jakarta : Pustaka Obor Populer.

Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan* 7:361-367.

Nony P.2013. Uji aktivitas antibakteri ektrak etanolik biji pinang (*Areca catechu* L) terhadap *Stapylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 27853. Fakultas Ilmu Kesehatan. Universitas Setia Budi Surakarta.

Nurainy F, Rizal S, Yudiantoro. 2008. Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar (sumur). *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian* 13:117-125.

Nurisda P. 2014. Aktivitas Antimikrob Fraksi Ekstrak Etanol Buah Pinang (*Areca cathechu* L.) pada bakteri *Methiciklin Resistant Staphylococcus aureus. MKB* 3 :94-98.

Pillete C, Durham RS. 2004. Mucosal Immunity in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A role of *Immunoglobulin A. Proc Am Thorac Sec*:1:125-35,

Pleczar MJ, Chan ECS. 1998. *Dasar-Dasar mikrobiologi*. Jilid 2. Hadioetomo RS, Imam T, angka SL, penerjemah; Jakarta: UI-Press. Terjemahan dari : *Element of Microbiology*

Podschun R, Ullmann U. 1998. *Klebsiella spp.* As Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical microbiology Reviews*;10:589-603.

Prasetyo H. 2012. Aktivitas antibakteri dan bioautografi fraksi semipolar ekstrak etanol daun sirsak *(Annona muricata* L.*)* terhadap *Klebsiella pneumoniae dan Staphylococcus epidermidis*. [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Putu ESKY, dkk. 2017. Skrining fitokimia dan analisis kromatografi lapis tipis ekstrak tanaman Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L). *Medicamento* 3 hlmn 275-282

Radji. M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. 7, 21-24, 27-32.

Rahardja F. 2006. Efek kombinasi ampisilin dan kloramfenikol terhadap *Streptococcus pneumoniae* dan *Klebsiella pneumomiae*. *Departemen Farmasi ITB.*

Ramyashree.M, Krisna Ram H, Shevabavaiah. 2012. Ethnomedicinal value of opuntia elatior fruits and its effect in mice. *Journal of pharmacy research. 8:45554-4558.*

Ravikumar S, Syed A, Ramu A, Ferosekhan M. 2011. Antibacterial activity of chosen mangrove plants against bacterial specified pathogens. *World Applied Sciences Journal* 14: 1198- 1202.

Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi.* Bandung: ITB Press. hlm 71- 72, 157, 191 – 192, 208. Terjemahan dari : *High Organik Plant Conctent.*

Sari, LORK., 2006, Pemanfaatan obat tradisional dengan pertimbangan manfaat dan keamanan. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 3 (1) 01-07

Schroll C., Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. 2010, role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneunomiae* biofilin formation, http;//www.biomededcentral.com/1471-2180/10/179 [Juni 2017]

Sudarsono, Pudjoarinto A, Gunawan D,Wahyuonos, Donatus IA, Drajad M. 1996. *Tumbuhan Obat.* Yogyakarta : Pusat Penelitian Obat Tradisional Universitas Gajah Mada.

Suharto MAP, Edy HJ, Dumanauw JM. 2012. Isolasi dan identifikasi senyawa saponin dari ekstrak metanol batang pisang ambon *(Musa paradisiaca var. sapientum* L.*). Pharmacon* 1: 89.

Suriawiria U. 2005. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Bandung: Angkasa, 60-61, 57-58

Syamsuhidayat SS dan Hutapea JR. 2001. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia. Jilid I*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. hlm 305-306.

Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. 2011. Phytochemical screening and extractoin. *Internationale Pharmacutica Sciecia* 1:98-106.

Umi Y, Mirna S, Minarti. 2013. Uji antibakteri ektrak, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan daun pecut kuda *(stachytarpheta jamaicencis* L. Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia. *Indonesian Journal of Pharmaceutical and Technology* 2 (2) halaman 374-383

Voigt R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi.* Soendani NS, penerjemah; Yogyakarta: UGM Press. Terjemahan dari : *Pharmaceutical Technology Textbook.*

Widiastuti AKS *et all*. 2014. Skrining fitokima dan identifikasi komponen utama ekstrak etanol kulit durian *(Durio zibethinus Murr.)* varietas petruk. Surakarta: *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia IV.*

[WHO] World Health Organization. 2003. *Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testting of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World*. Geneva 27 Switzerland. hlm 125

Lampiran 1. Determinasi biji pinang

UNIVERSITAS SETIA BUDI

UPT- LABORATORIUM

No : 229/DET/UPT-LAB/19/III/2018
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :
Nama : Yusafian Bagus K D
NIM : 20144132 A
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Pinang / *Areca catechu* L.**
Hasil determinasi berdasarkan : Steenis : FLORA
1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7a – 8b. Familia 21. Palmae. 1b – 3b – 4b – 6b – 7a – 7b – 9b.10. Areca. ***Areca catechu* L.**

Deskripsi :
Habitus : Pohon, sampai tinggi 25 m.
Batang : Tidak bercabang, langsing, besar lk 15 cm, tajuk tidak rimbun.
Daun : Pelepah daun berbentuk tabung, panjang lk 80 cm; tangkai daun pendek; anak daun 85 cm, lebar lk 5cm, ujung sobek dan bergigi.
Bunga : Tongkol bunga dengan seludang (spatha) yang panjang dan mudah rontok, muncul di bawah daun, panjang lk 75 cm, dengan tangkai pendek bercabang rangkap, sumbu ujung sampai panjang 35 cm, dengan 1 bunga betina pada pangkal, di atasnya dengan banyak bunga jantan tersusun dalam 2 baris yang tertancap dalam alur. Bunga jantan panjang 4 mm, putih kuning, benangsari 6. Bunga betina panjang lk 1,5 cm, hijau, bakal buah beruang 1.
Buah : Buni, bulat telur terbalik memanjang, merah oranye, panjang lk 6 cm, dinding buah berserabut.
Biji : Satu, berbentuk bulat telur, ada gambaran seperti jala.

Pustaka : Steenis C.G.G.J., Bloembergen S. Eyma P.J. (1978): *FLORA*, PT PradnyaParamita. Jl. KebonSirih 46.Jakarta Pusat, 1978.

Surakarta, 19 Maret 2018
Timdeterminasi

Dra. Kartinah Wirjosoendjojo, SU

Jl. Let.jen Sutoyo, Mojosongo-Solo 57127 Telp.0271-852518, Fax.0271-853275
Homepage : www.setiabudi.ac.id, e-mail : info@setiabudi.co.id

Lampiran 2. Pengolahan data menggunakan SPPSS

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
diameter	42	14,79	8,467	0	31

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		diameter
N		42
Normal Parameters[a,b]	Mean	14,79
	Std. Deviation	8,467
Most Extreme Differences	Absolute	,201
	Positive	,090
	Negative	-,201
Kolmogorov-Smirnov Z		1,300
Asymp. Sig. (2-tailed)		,068

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Signifikasi 0,068 > 0,05 maka H_0 diterima dan data terdistribusi normal.

Descriptives

Diameter

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Ciprofloksasin	3	30,67	,577	,333	29,23	32,10	30	31
Dmso	3	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
ekstrak 50%	3	15,33	,577	,333	13,90	16,77	15	16
ekstrak 25%	3	17,67	2,082	1,202	12,50	22,84	16	20
ekstrak 12,5%	3	15,00	,000	,000	15,00	15,00	15	15
n-heksana 50%	3	5,00	1,000	,577	2,52	7,48	4	6
n-heksana 25%	3	5,00	2,646	1,528	-1,57	11,57	3	8
n-heksana 12,5 %	3	4,67	3,786	2,186	-4,74	14,07	2	9
etil asetat 50%	3	18,00	1,000	,577	15,52	20,48	17	19
etil asetat 25%	3	24,33	2,082	1,202	19,16	29,50	22	26
etil asetat 12,5%	3	22,67	2,309	1,333	16,93	28,40	20	24
air 50%	3	16,67	,577	,333	15,23	18,10	16	17
air 25%	3	17,00	2,000	1,155	12,03	21,97	15	19
air 12,5 %	3	15,00	3,000	1,732	7,55	22,45	12	18
Total	42	14,79	8,467	1,306	12,15	17,42	0	31

Test of Homogeneity of Variances

Diameter

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,197	13	28	,005

Data dinyatakan Homogen.

ANOVA

Diameter

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2836,405	13	218,185	59,505	,000
Within Groups	102,667	28	3,667		
Total	2939,071	41			

Post Hoc Test

Multiple Comparisons

Dependent Variable:diameter

	(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Ciprofloksasin	Dmso	30,667*	1,563	,000	24,94	36,39
		ekstrak 50%	15,333*	1,563	,000	9,61	21,06
		ekstrak 25%	13,000*	1,563	,000	7,28	18,72
		ekstrak 12,5%	15,667*	1,563	,000	9,94	21,39
		n-heksana 50%	25,667*	1,563	,000	19,94	31,39
		n-heksana 25%	25,667*	1,563	,000	19,94	31,39
		n-heksana 12,5 %	26,000*	1,563	,000	20,28	31,72
		etil asetat 50%	12,667*	1,563	,000	6,94	18,39
		etil asetat 25%	6,333*	1,563	,020	,61	12,06
		etil asetat 12,5%	8,000*	1,563	,001	2,28	13,72
		air 50%	14,000*	1,563	,000	8,28	19,72
		air 25%	13,667*	1,563	,000	7,94	19,39
		air 12,5 %	15,667*	1,563	,000	9,94	21,39
	Dmso	Ciprofloksasin	-30,667*	1,563	,000	-36,39	-24,94
		ekstrak 50%	-15,333*	1,563	,000	-21,06	-9,61
		ekstrak 25%	-17,667*	1,563	,000	-23,39	-11,94
		ekstrak 12,5%	-15,000*	1,563	,000	-20,72	-9,28
		n-heksana 50%	-5,000	1,563	,134	-10,72	,72
		n-heksana 25%	-5,000	1,563	,134	-10,72	,72
		n-heksana 12,5 %	-4,667	1,563	,202	-10,39	1,06
		etil asetat 50%	-18,000*	1,563	,000	-23,72	-12,28
		etil asetat 25%	-24,333*	1,563	,000	-30,06	-18,61
		etil asetat 12,5%	-22,667*	1,563	,000	-28,39	-16,94
		air 50%	-16,667*	1,563	,000	-22,39	-10,94
		air 25%	-17,000*	1,563	,000	-22,72	-11,28
		air 12,5 %	-15,000*	1,563	,000	-20,72	-9,28
	ekstrak 50%	Ciprofloksasin	-15,333*	1,563	,000	-21,06	-9,61
		Dmso	15,333*	1,563	,000	9,61	21,06
		ekstrak 25%	-2,333	1,563	,958	-8,06	3,39

		ekstrak 12,5%	,333	1,563	1,000	-5,39	6,06
		n-heksana 50%	10,333*	1,563	,000	4,61	16,06
		n-heksana 25%	10,333*	1,563	,000	4,61	16,06
		n-heksana 12,5 %	10,667*	1,563	,000	4,94	16,39
		etil asetat 50%	-2,667	1,563	,897	-8,39	3,06
		etil asetat 25%	-9,000*	1,563	,000	-14,72	-3,28
		etil asetat 12,5%	-7,333*	1,563	,004	-13,06	-1,61
		air 50%	-1,333	1,563	1,000	-7,06	4,39
		air 25%	-1,667	1,563	,998	-7,39	4,06
		air 12,5 %	,333	1,563	1,000	-5,39	6,06
	ekstrak 25%	Ciprofloksasin	-13,000*	1,563	,000	-18,72	-7,28
		dmso	17,667*	1,563	,000	11,94	23,39
		ekstrak 50%	2,333	1,563	,958	-3,39	8,06
		ekstrak 12,5%	2,667	1,563	,897	-3,06	8,39
		n-heksana 50%	12,667*	1,563	,000	6,94	18,39
		n-heksana 25%	12,667*	1,563	,000	6,94	18,39
		n-heksana 12,5 %	13,000*	1,563	,000	7,28	18,72
		etil asetat 50%	-,333	1,563	1,000	-6,06	5,39
		etil asetat 25%	-6,667*	1,563	,012	-12,39	-,94
		etil asetat 12,5%	-5,000	1,563	,134	-10,72	,72
		air 50%	1,000	1,563	1,000	-4,72	6,72
		air 25%	,667	1,563	1,000	-5,06	6,39
		air 12,5 %	2,667	1,563	,897	-3,06	8,39
	ekstrak 12,5%	siprofloksasil	-15,667*	1,563	,000	-21,39	-9,94
		dmso	15,000*	1,563	,000	9,28	20,72
		ekstrak 50%	-,333	1,563	1,000	-6,06	5,39
		ekstrak 25%	-2,667	1,563	,897	-8,39	3,06
		n-heksana 50%	10,000*	1,563	,000	4,28	15,72
		n-heksana 25%	10,000*	1,563	,000	4,28	15,72
		n-heksana 12,5 %	10,333*	1,563	,000	4,61	16,06
		etil asetat 50%	-3,000	1,563	,800	-8,72	2,72
		etil asetat 25%	-9,333*	1,563	,000	-15,06	-3,61
		etil asetat 12,5%	-7,667*	1,563	,002	-13,39	-1,94
		air 50%	-1,667	1,563	,998	-7,39	4,06

	air 25%	-2,000	1,563	,988	-7,72	3,72
	air 12,5 %	,000	1,563	1,000	-5,72	5,72
n-heksana 50%	Ciprofloksasin	-25,667*	1,563	,000	-31,39	-19,94
	dmso	5,000	1,563	,134	-,72	10,72
	ekstrak 50%	-10,333*	1,563	,000	-16,06	-4,61
	ekstrak 25%	-12,667*	1,563	,000	-18,39	-6,94
	ekstrak 12,5%	-10,000*	1,563	,000	-15,72	-4,28
	n-heksana 25%	,000	1,563	1,000	-5,72	5,72
	n-heksana 12,5 %	,333	1,563	1,000	-5,39	6,06
	etil asetat 50%	-13,000*	1,563	,000	-18,72	-7,28
	etil asetat 25%	-19,333*	1,563	,000	-25,06	-13,61
	etil asetat 12,5%	-17,667*	1,563	,000	-23,39	-11,94
	air 50%	-11,667*	1,563	,000	-17,39	-5,94
	air 25%	-12,000*	1,563	,000	-17,72	-6,28
	air 12,5 %	-10,000*	1,563	,000	-15,72	-4,28
n-heksana 25%	Ciprofloksasin	-25,667*	1,563	,000	-31,39	-19,94
	dmso	5,000	1,563	,134	-,72	10,72
	ekstrak 50%	-10,333*	1,563	,000	-16,06	-4,61
	ekstrak 25%	-12,667*	1,563	,000	-18,39	-6,94
	ekstrak 12,5%	-10,000*	1,563	,000	-15,72	-4,28
	n-heksana 50%	,000	1,563	1,000	-5,72	5,72
	n-heksana 12,5 %	,333	1,563	1,000	-5,39	6,06
	etil asetat 50%	-13,000*	1,563	,000	-18,72	-7,28
	etil asetat 25%	-19,333*	1,563	,000	-25,06	-13,61
	etil asetat 12,5%	-17,667*	1,563	,000	-23,39	-11,94
	air 50%	-11,667*	1,563	,000	-17,39	-5,94
	air 25%	-12,000*	1,563	,000	-17,72	-6,28
	air 12,5 %	-10,000*	1,563	,000	-15,72	-4,28
n-heksana 12,5 %	Ciprofloksasin	-26,000*	1,563	,000	-31,72	-20,28
	dmso	4,667	1,563	,202	-1,06	10,39
	ekstrak 50%	-10,667*	1,563	,000	-16,39	-4,94
	ekstrak 25%	-13,000*	1,563	,000	-18,72	-7,28
	ekstrak 12,5%	-10,333*	1,563	,000	-16,06	-4,61
	n-heksana 50%	-,333	1,563	1,000	-6,06	5,39
	n-heksana 25%	-,333	1,563	1,000	-6,06	5,39

	etil asetat 50%	-13,333*	1,563	,000	-19,06	-7,61
	etil asetat 25%	-19,667*	1,563	,000	-25,39	-13,94
	etil asetat 12,5%	-18,000*	1,563	,000	-23,72	-12,28
	air 50%	-12,000*	1,563	,000	-17,72	-6,28
	air 25%	-12,333*	1,563	,000	-18,06	-6,61
	air 12,5 %	-10,333*	1,563	,000	-16,06	-4,61
etil asetat 50%	Ciprofloksasin	-12,667*	1,563	,000	-18,39	-6,94
	dmso	18,000*	1,563	,000	12,28	23,72
	ekstrak 50%	2,667	1,563	,897	-3,06	8,39
	ekstrak 25%	,333	1,563	1,000	-5,39	6,06
	ekstrak 12,5%	3,000	1,563	,800	-2,72	8,72
	n-heksana 50%	13,000*	1,563	,000	7,28	18,72
	n-heksana 25%	13,000*	1,563	,000	7,28	18,72
	n-heksana 12,5 %	13,333*	1,563	,000	7,61	19,06
	etil asetat 25%	-6,333*	1,563	,020	-12,06	-,61
	etil asetat 12,5%	-4,667	1,563	,202	-10,39	1,06
	air 50%	1,333	1,563	1,000	-4,39	7,06
	air 25%	1,000	1,563	1,000	-4,72	6,72
	air 12,5 %	3,000	1,563	,800	-2,72	8,72
etil asetat 25%	Ciprofloksasin	-6,333*	1,563	,020	-12,06	-,61
	Dmso	24,333*	1,563	,000	18,61	30,06
	ekstrak 50%	9,000*	1,563	,000	3,28	14,72
	ekstrak 25%	6,667*	1,563	,012	,94	12,39
	ekstrak 12,5%	9,333*	1,563	,000	3,61	15,06
	n-heksana 50%	19,333*	1,563	,000	13,61	25,06
	n-heksana 25%	19,333*	1,563	,000	13,61	25,06
	n-heksana 12,5 %	19,667*	1,563	,000	13,94	25,39
	etil asetat 50%	6,333*	1,563	,020	,61	12,06
	etil asetat 12,5%	1,667	1,563	,998	-4,06	7,39
	air 50%	7,667*	1,563	,002	1,94	13,39
	air 25%	7,333*	1,563	,004	1,61	13,06
	air 12,5 %	9,333*	1,563	,000	3,61	15,06
etil asetat 12,5%	Ciprofloksasin	-8,000*	1,563	,001	-13,72	-2,28
	dmso	22,667*	1,563	,000	16,94	28,39
	ekstrak 50%	7,333*	1,563	,004	1,61	13,06

		ekstrak 25%	5,000	1,563	,134	-,72	10,72
		ekstrak 12,5%	7,667*	1,563	,002	1,94	13,39
		n-heksana 50%	17,667*	1,563	,000	11,94	23,39
		n-heksana 25%	17,667*	1,563	,000	11,94	23,39
		n-heksana 12,5 %	18,000*	1,563	,000	12,28	23,72
		etil asetat 50%	4,667	1,563	,202	-1,06	10,39
		etil asetat 25%	-1,667	1,563	,998	-7,39	4,06
		air 50%	6,000*	1,563	,033	,28	11,72
		air 25%	5,667	1,563	,054	-,06	11,39
		air 12,5 %	7,667*	1,563	,002	1,94	13,39
	air 50%	Ciprofloksasin	-14,000*	1,563	,000	-19,72	-8,28
		Dmso	16,667*	1,563	,000	10,94	22,39
		ekstrak 50%	1,333	1,563	1,000	-4,39	7,06
		ekstrak 25%	-1,000	1,563	1,000	-6,72	4,72
		ekstrak 12,5%	1,667	1,563	,998	-4,06	7,39
		n-heksana 50%	11,667*	1,563	,000	5,94	17,39
		n-heksana 25%	11,667*	1,563	,000	5,94	17,39
		n-heksana 12,5 %	12,000*	1,563	,000	6,28	17,72
		etil asetat 50%	-1,333	1,563	1,000	-7,06	4,39
		etil asetat 25%	-7,667*	1,563	,002	-13,39	-1,94
		etil asetat 12,5%	-6,000*	1,563	,033	-11,72	-,28
		air 25%	-,333	1,563	1,000	-6,06	5,39
		air 12,5 %	1,667	1,563	,998	-4,06	7,39
	air 25%	Ciprofloksasin	-13,667*	1,563	,000	-19,39	-7,94
		Dmso	17,000*	1,563	,000	11,28	22,72
		ekstrak 50%	1,667	1,563	,998	-4,06	7,39
		ekstrak 25%	-,667	1,563	1,000	-6,39	5,06
		ekstrak 12,5%	2,000	1,563	,988	-3,72	7,72
		n-heksana 50%	12,000*	1,563	,000	6,28	17,72
		n-heksana 25%	12,000*	1,563	,000	6,28	17,72
		n-heksana 12,5 %	12,333*	1,563	,000	6,61	18,06
		etil asetat 50%	-1,000	1,563	1,000	-6,72	4,72
		etil asetat 25%	-7,333*	1,563	,004	-13,06	-1,61
		etil asetat 12,5%	-5,667	1,563	,054	-11,39	,06

		air 50%	,333	1,563	1,000	-5,39	6,06
		air 12,5 %	2,000	1,563	,988	-3,72	7,72
	air 12,5 %	Ciprofloksasin	-15,667*	1,563	,000	-21,39	-9,94
		Dmso	15,000*	1,563	,000	9,28	20,72
		ekstrak 50%	-,333	1,563	1,000	-6,06	5,39
		ekstrak 25%	-2,667	1,563	,897	-8,39	3,06
		ekstrak 12,5%	,000	1,563	1,000	-5,72	5,72
		n-heksana 50%	10,000*	1,563	,000	4,28	15,72
		n-heksana 25%	10,000*	1,563	,000	4,28	15,72
		n-heksana 12,5 %	10,333*	1,563	,000	4,61	16,06
		etil asetat 50%	-3,000	1,563	,800	-8,72	2,72
		etil asetat 25%	-9,333*	1,563	,000	-15,06	-3,61
		etil asetat 12,5%	-7,667*	1,563	,002	-13,39	-1,94
		air 50%	-1,667	1,563	,998	-7,39	4,06
		air 25%	-2,000	1,563	,988	-7,72	3,72
Bonferroni	Ciprofloksasin	dmso	30,667*	1,563	,000	24,57	36,76
		ekstrak 50%	15,333*	1,563	,000	9,24	21,43
		ekstrak 25%	13,000*	1,563	,000	6,90	19,10
		ekstrak 12,5%	15,667*	1,563	,000	9,57	21,76
		n-heksana 50%	25,667*	1,563	,000	19,57	31,76
		n-heksana 25%	25,667*	1,563	,000	19,57	31,76
		n-heksana 12,5 %	26,000*	1,563	,000	19,90	32,10
		etil asetat 50%	12,667*	1,563	,000	6,57	18,76
		etil asetat 25%	6,333*	1,563	,033	,24	12,43
		etil asetat 12,5%	8,000*	1,563	,002	1,90	14,10
		air 50%	14,000*	1,563	,000	7,90	20,10
		air 25%	13,667*	1,563	,000	7,57	19,76
		air 12,5 %	15,667*	1,563	,000	9,57	21,76
	dmso	Ciprofloksasin	-30,667*	1,563	,000	-36,76	-24,57
		ekstrak 50%	-15,333*	1,563	,000	-21,43	-9,24
		ekstrak 25%	-17,667*	1,563	,000	-23,76	-11,57
		ekstrak 12,5%	-15,000*	1,563	,000	-21,10	-8,90
		n-heksana 50%	-5,000	1,563	,311	-11,10	1,10
		n-heksana 25%	-5,000	1,563	,311	-11,10	1,10

		n-heksana 12,5 %	-4,667	1,563	,531	-10,76	1,43
		etil asetat 50%	-18,000*	1,563	,000	-24,10	-11,90
		etil asetat 25%	-24,333*	1,563	,000	-30,43	-18,24
		etil asetat 12,5%	-22,667*	1,563	,000	-28,76	-16,57
		air 50%	-16,667*	1,563	,000	-22,76	-10,57
		air 25%	-17,000*	1,563	,000	-23,10	-10,90
		air 12,5 %	-15,000*	1,563	,000	-21,10	-8,90
	ekstrak 50%	Ciprofloksasin	-15,333*	1,563	,000	-21,43	-9,24
		Dmso	15,333*	1,563	,000	9,24	21,43
		ekstrak 25%	-2,333	1,563	1,000	-8,43	3,76
		ekstrak 12,5%	,333	1,563	1,000	-5,76	6,43
		n-heksana 50%	10,333*	1,563	,000	4,24	16,43
		n-heksana 25%	10,333*	1,563	,000	4,24	16,43
		n-heksana 12,5 %	10,667*	1,563	,000	4,57	16,76
		etil asetat 50%	-2,667	1,563	1,000	-8,76	3,43
		etil asetat 25%	-9,000*	1,563	,000	-15,10	-2,90
		etil asetat 12,5%	-7,333*	1,563	,006	-13,43	-1,24
		air 50%	-1,333	1,563	1,000	-7,43	4,76
		air 25%	-1,667	1,563	1,000	-7,76	4,43
		air 12,5 %	,333	1,563	1,000	-5,76	6,43
	ekstrak 25%	Ciprofloksasin	-13,000*	1,563	,000	-19,10	-6,90
		Dmso	17,667*	1,563	,000	11,57	23,76
		ekstrak 50%	2,333	1,563	1,000	-3,76	8,43
		ekstrak 12,5%	2,667	1,563	1,000	-3,43	8,76
		n-heksana 50%	12,667*	1,563	,000	6,57	18,76
		n-heksana 25%	12,667*	1,563	,000	6,57	18,76
		n-heksana 12,5 %	13,000*	1,563	,000	6,90	19,10
		etil asetat 50%	-,333	1,563	1,000	-6,43	5,76
		etil asetat 25%	-6,667*	1,563	,019	-12,76	-,57
		etil asetat 12,5%	-5,000	1,563	,311	-11,10	1,10
		air 50%	1,000	1,563	1,000	-5,10	7,10
		air 25%	,667	1,563	1,000	-5,43	6,76
		air 12,5 %	2,667	1,563	1,000	-3,43	8,76
	ekstrak 12,5%	Ciprofloksasin	-15,667*	1,563	,000	-21,76	-9,57

	Dmso	15,000*	1,563	,000	8,90	21,10
	ekstrak 50%	-,333	1,563	1,000	-6,43	5,76
	ekstrak 25%	-2,667	1,563	1,000	-8,76	3,43
	n-heksana 50%	10,000*	1,563	,000	3,90	16,10
	n-heksana 25%	10,000*	1,563	,000	3,90	16,10
	n-heksana 12,5 %	10,333*	1,563	,000	4,24	16,43
	etil asetat 50%	-3,000	1,563	1,000	-9,10	3,10
	etil asetat 25%	-9,333*	1,563	,000	-15,43	-3,24
	etil asetat 12,5%	-7,667*	1,563	,003	-13,76	-1,57
	air 50%	-1,667	1,563	1,000	-7,76	4,43
	air 25%	-2,000	1,563	1,000	-8,10	4,10
	air 12,5 %	,000	1,563	1,000	-6,10	6,10
n-heksana 50%	Ciprofloksasin	-25,667*	1,563	,000	-31,76	-19,57
	Dmso	5,000	1,563	,311	-1,10	11,10
	ekstrak 50%	-10,333*	1,563	,000	-16,43	-4,24
	ekstrak 25%	-12,667*	1,563	,000	-18,76	-6,57
	ekstrak 12,5%	-10,000*	1,563	,000	-16,10	-3,90
	n-heksana 25%	,000	1,563	1,000	-6,10	6,10
	n-heksana 12,5 %	,333	1,563	1,000	-5,76	6,43
	etil asetat 50%	-13,000*	1,563	,000	-19,10	-6,90
	etil asetat 25%	-19,333*	1,563	,000	-25,43	-13,24
	etil asetat 12,5%	-17,667*	1,563	,000	-23,76	-11,57
	air 50%	-11,667*	1,563	,000	-17,76	-5,57
	air 25%	-12,000*	1,563	,000	-18,10	-5,90
	air 12,5 %	-10,000*	1,563	,000	-16,10	-3,90
n-heksana 25%	Ciprofloksasin	-25,667*	1,563	,000	-31,76	-19,57
	Dmso	5,000	1,563	,311	-1,10	11,10
	ekstrak 50%	-10,333*	1,563	,000	-16,43	-4,24
	ekstrak 25%	-12,667*	1,563	,000	-18,76	-6,57
	ekstrak 12,5%	-10,000*	1,563	,000	-16,10	-3,90
	n-heksana 50%	,000	1,563	1,000	-6,10	6,10
	n-heksana 12,5 %	,333	1,563	1,000	-5,76	6,43
	etil asetat 50%	-13,000*	1,563	,000	-19,10	-6,90
	etil asetat 25%	-19,333*	1,563	,000	-25,43	-13,24

	etil asetat 12,5%	-17,667*	1,563	,000	-23,76	-11,57
	air 50%	-11,667*	1,563	,000	-17,76	-5,57
	air 25%	-12,000*	1,563	,000	-18,10	-5,90
	air 12,5 %	-10,000*	1,563	,000	-16,10	-3,90
n-heksana 12,5 %	Ciprofloksasin	-26,000*	1,563	,000	-32,10	-19,90
	Dmso	4,667	1,563	,531	-1,43	10,76
	ekstrak 50%	-10,667*	1,563	,000	-16,76	-4,57
	ekstrak 25%	-13,000*	1,563	,000	-19,10	-6,90
	ekstrak 12,5%	-10,333*	1,563	,000	-16,43	-4,24
	n-heksana 50%	-,333	1,563	1,000	-6,43	5,76
	n-heksana 25%	-,333	1,563	1,000	-6,43	5,76
	etil asetat 50%	-13,333*	1,563	,000	-19,43	-7,24
	etil asetat 25%	-19,667*	1,563	,000	-25,76	-13,57
	etil asetat 12,5%	-18,000*	1,563	,000	-24,10	-11,90
	air 50%	-12,000*	1,563	,000	-18,10	-5,90
	air 25%	-12,333*	1,563	,000	-18,43	-6,24
	air 12,5 %	-10,333*	1,563	,000	-16,43	-4,24
etil asetat 50%	Ciprofloksasin	-12,667*	1,563	,000	-18,76	-6,57
	Dmso	18,000*	1,563	,000	11,90	24,10
	ekstrak 50%	2,667	1,563	1,000	-3,43	8,76
	ekstrak 25%	,333	1,563	1,000	-5,76	6,43
	ekstrak 12,5%	3,000	1,563	1,000	-3,10	9,10
	n-heksana 50%	13,000*	1,563	,000	6,90	19,10
	n-heksana 25%	13,000*	1,563	,000	6,90	19,10
	n-heksana 12,5 %	13,333*	1,563	,000	7,24	19,43
	etil asetat 25%	-6,333*	1,563	,033	-12,43	-,24
	etil asetat 12,5%	-4,667	1,563	,531	-10,76	1,43
	air 50%	1,333	1,563	1,000	-4,76	7,43
	air 25%	1,000	1,563	1,000	-5,10	7,10
	air 12,5 %	3,000	1,563	1,000	-3,10	9,10
etil asetat 25%	Ciprofloksasin	-6,333*	1,563	,033	-12,43	-,24
	Dmso	24,333*	1,563	,000	18,24	30,43
	ekstrak 50%	9,000*	1,563	,000	2,90	15,10
	ekstrak 25%	6,667*	1,563	,019	,57	12,76
	ekstrak 12,5%	9,333*	1,563	,000	3,24	15,43
	n-heksana 50%	19,333*	1,563	,000	13,24	25,43

		n-heksana 25%	19,333*	1,563	,000	13,24	25,43
		n-heksana 12,5 %	19,667*	1,563	,000	13,57	25,76
		etil asetat 50%	6,333*	1,563	,033	,24	12,43
		etil asetat 12,5%	1,667	1,563	1,000	-4,43	7,76
		air 50%	7,667*	1,563	,003	1,57	13,76
		air 25%	7,333*	1,563	,006	1,24	13,43
		air 12,5 %	9,333*	1,563	,000	3,24	15,43
	etil asetat 12,5%	Ciprofloksasin	-8,000*	1,563	,002	-14,10	-1,90
		Dmso	22,667*	1,563	,000	16,57	28,76
		ekstrak 50%	7,333*	1,563	,006	1,24	13,43
		ekstrak 25%	5,000	1,563	,311	-1,10	11,10
		ekstrak 12,5%	7,667*	1,563	,003	1,57	13,76
		n-heksana 50%	17,667*	1,563	,000	11,57	23,76
		n-heksana 25%	17,667*	1,563	,000	11,57	23,76
		n-heksana 12,5 %	18,000*	1,563	,000	11,90	24,10
		etil asetat 50%	4,667	1,563	,531	-1,43	10,76
		etil asetat 25%	-1,667	1,563	1,000	-7,76	4,43
		air 50%	6,000	1,563	,059	-,10	12,10
		air 25%	5,667	1,563	,104	-,43	11,76
		air 12,5 %	7,667*	1,563	,003	1,57	13,76
	air 50%	Ciprofloksasin	-14,000*	1,563	,000	-20,10	-7,90
		Dmso	16,667*	1,563	,000	10,57	22,76
		ekstrak 50%	1,333	1,563	1,000	-4,76	7,43
		ekstrak 25%	-1,000	1,563	1,000	-7,10	5,10
		ekstrak 12,5%	1,667	1,563	1,000	-4,43	7,76
		n-heksana 50%	11,667*	1,563	,000	5,57	17,76
		n-heksana 25%	11,667*	1,563	,000	5,57	17,76
		n-heksana 12,5 %	12,000*	1,563	,000	5,90	18,10
		etil asetat 50%	-1,333	1,563	1,000	-7,43	4,76
		etil asetat 25%	-7,667*	1,563	,003	-13,76	-1,57
		etil asetat 12,5%	-6,000	1,563	,059	-12,10	,10
		air 25%	-,333	1,563	1,000	-6,43	5,76
		air 12,5 %	1,667	1,563	1,000	-4,43	7,76
	air 25%	Ciprofloksasin	-13,667*	1,563	,000	-19,76	-7,57

		Dmso	17,000*	1,563	,000	10,90	23,10
		ekstrak 50%	1,667	1,563	1,000	-4,43	7,76
		ekstrak 25%	-,667	1,563	1,000	-6,76	5,43
		ekstrak 12,5%	2,000	1,563	1,000	-4,10	8,10
		n-heksana 50%	12,000*	1,563	,000	5,90	18,10
		n-heksana 25%	12,000*	1,563	,000	5,90	18,10
		n-heksana 12,5 %	12,333*	1,563	,000	6,24	18,43
		etil asetat 50%	-1,000	1,563	1,000	-7,10	5,10
		etil asetat 25%	-7,333*	1,563	,006	-13,43	-1,24
		etil asetat 12,5%	-5,667	1,563	,104	-11,76	,43
		air 50%	,333	1,563	1,000	-5,76	6,43
		air 12,5 %	2,000	1,563	1,000	-4,10	8,10
	air 12,5 %	Ciprofloksasin	-15,667*	1,563	,000	-21,76	-9,57
		Dmso	15,000*	1,563	,000	8,90	21,10
		ekstrak 50%	-,333	1,563	1,000	-6,43	5,76
		ekstrak 25%	-2,667	1,563	1,000	-8,76	3,43
		ekstrak 12,5%	,000	1,563	1,000	-6,10	6,10
		n-heksana 50%	10,000*	1,563	,000	3,90	16,10
		n-heksana 25%	10,000*	1,563	,000	3,90	16,10
		n-heksana 12,5 %	10,333*	1,563	,000	4,24	16,43
		etil asetat 50%	-3,000	1,563	1,000	-9,10	3,10
		etil asetat 25%	-9,333*	1,563	,000	-15,43	-3,24
		etil asetat 12,5%	-7,667*	1,563	,003	-13,76	-1,57
		air 50%	-1,667	1,563	1,000	-7,76	4,43
		air 25%	-2,000	1,563	1,000	-8,10	4,10

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

Homogenoeus Subsets

Diameter

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Tukey HSD[a]	Dmso	3	,00				
	n-heksana 12,5 %	3	4,67				
	n-heksana 50%	3	5,00				
	n-heksana 25%	3	5,00				
	ekstrak 12,5%	3		15,00			
	air 12,5 %	3		15,00			
	ekstrak 50%	3		15,33			
	air 50%	3		16,67			
	air 25%	3		17,00	17,00		
	ekstrak 25%	3		17,67	17,67		
	etil asetat 50%	3		18,00	18,00		
	etil asetat 12,5%	3			22,67	22,67	
	etil asetat 25%	3				24,33	
	Ciprofloksasin	3					30,67
	Sig.		,134	,800	,054	,998	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 3. Foto tanaman pinang

Gambar 1. Pohon pinang

Gambar 2. Biji pinang

Gambar 3. Serbuk biji pinang

Lampiran 4. Ekstrak dan fraksi biji pinang

Gambar 4. Ekstrak kental biji pinang

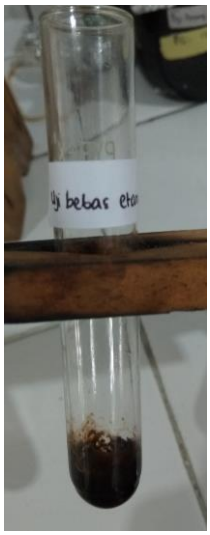
Gambar 5. Fraksinasi ekstrak biji pinang

Lampiran 5. Alat penelitian

Gambar 6. ***moisture balance***

Gambar 7. Oven binder

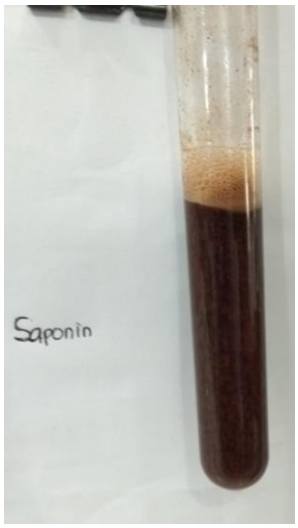
Lampiran 6. Uji bebas etanol dan identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pinang



Gambar 10. Uji bebas etanol

Gambar 11. Uji Alkaloid (Mayer dan Dragendroff)

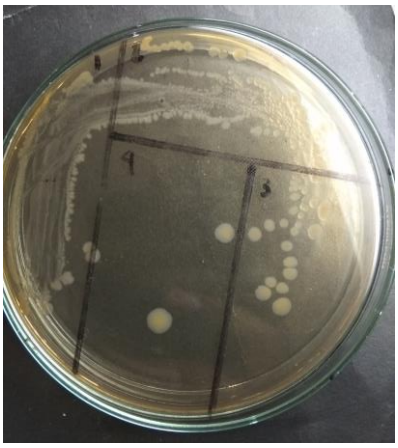
Gambar 12. Uji Flavonoid



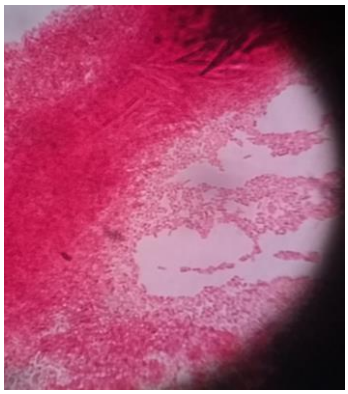
Gambar 13. Uji saponin

Gambar 14. Uji tanin

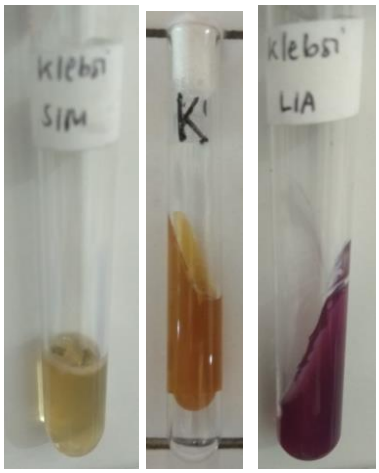
Lampiran 7. Hasil identifikasi bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031



Gambar 15. Identifikasi *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 pada media MCA

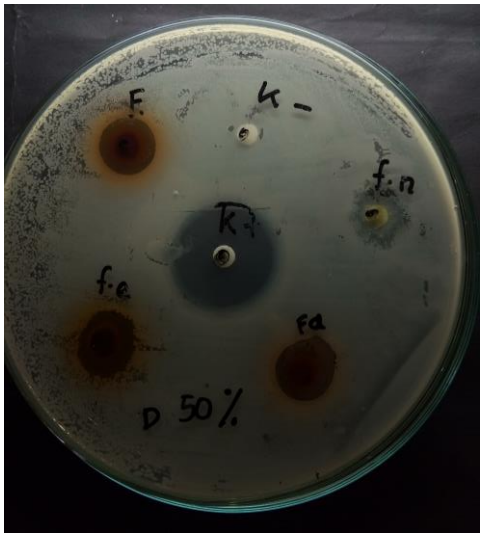


Gambar 16. Hasil pewarnaan gram.



Gambar 17. Uji biokimia *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031

Lampiran 8. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan ekstrak etanol biji pinang terhadap *Klebsiella pneuoimiae* ATCC 10031 secara difusi konsentrasi 50%.

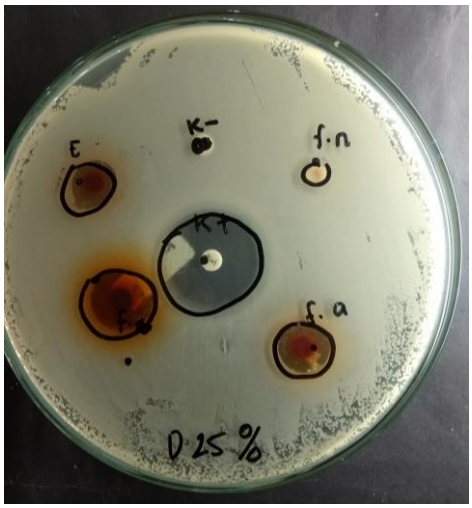


Gambar 18. Inokulasi fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan ekstrak biji pinang terhadap terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 difusi konsentrasi 50%

Keterangan :

E : Ekstrak
F.n : Fraksi n-Heksana
F.e : Fraksi Etil asetat
F.a : Fraksi Air
K+ : ciprofloksasil
K- : DMSO 5%

Lampiran 9. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan ekstrak etanol biji pinang terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 secara difusi konsentrasi 25%.



Gambar 19. Inokulasi fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan ekstrak biji pinang terhadap terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 difusi konsentrasi 25%

Keterangan :

E : Ekstrak
F.n : Fraksi n-Heksana
F.e : Fraksi Etil asetat
F.a : Fraksi Air
K+ : ciprofloksasil
K- : DMSO 5%

Lampiran 10. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan ekstrak etanol biji pinang terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 secara difusi konsentrasi 12,5%

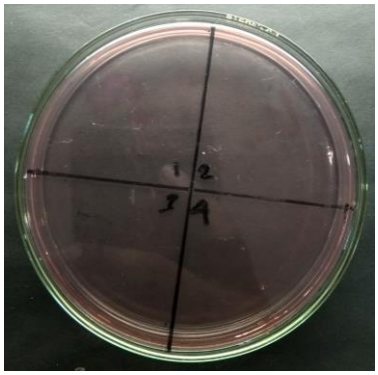
Gambar 20. Inokulasi fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan ekstrak biji pinang terhadap terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 difusi konsentrasi 12,5%

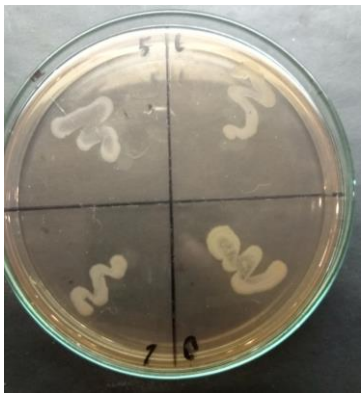
Keterangan :

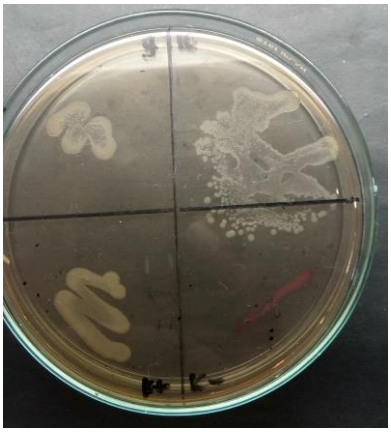
E : Ekstrak
F.n : Fraksi n-Heksana
F.e : Fraksi Etil asetat
F.a : Fraksi Air
K+ : ciprofloksasil
K- : DMSO 5%

Lampiran 11. Hasil uji antibakteri fraksi teraktif etil asetat biji pinang terhadap bakteri *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 secara dilusi.

Gambar 21. Foto pengenceran tabung fraksi etil asetat biji pinang terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031







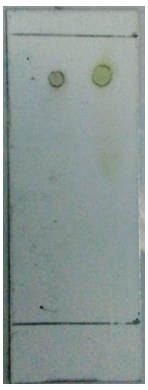
Gambar 22. Inokulasi fraksi etil asetat biji pinang terhadap *Klebsiella pneunomiae* ATCC 10031 pada media MCA

Keterangan :

1. Konsentrasi 50%
2. Konsentrasi 25%
3. Konsentrasi 12,5%
4. Konsentrasi 6,25%
5. Konsentrasi 3,125%
6. Konsentrasi 1,56%
7. Konsentrasi 0,78%
8. Konsentrasi 0,39%
9. Konsentrasi 0,195%
10. Konsentrasi 0,097%
K+ : suspensi bakteri
K- : BHI + ekstrak

Lampiran 12. Hasil uji KLT fraksi teraktif etil asetat dan perhitungan Rf

1. Hasil identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) golongan senyawa flavonoid

UV_{254}	**UV_{366}**	**Sitroborat**
		

Keterangan: :

S : Sampel

P : Standar

2. Hasil identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) golongan senyawa saponin.

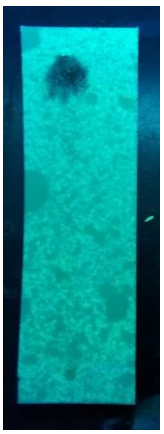
UV_{254}	**UV_{366}**	**LB**
S P	**S P**	**S P**

Keterangan: :

S : Sampel

P : Standar

3. Hasil identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) golongan senyawa tanin

UV_{254}	UV_{366}	LB
		
S	**S**	**S**

Keterangan: :

S : Sampel

4. Perhitungan Rf

$$Rf = \frac{\text{jarak bercak dari awal totolan}}{\text{jarak elusi}}$$

a. Flavonoid

Rf quersetin $= \frac{4,3}{5,0} = 0,86$

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

b. Saponin

Rf saponin $= \frac{5,2}{6,0} = 0,86$

Rf sampel $= \frac{5,1}{6,0} = 0,85$

c. Tanin

Rf sampel $= \frac{5,3}{6,0} = 0,88$

Lampiran 13. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (% b/b)
5500	1970	35,81

Perhitungan bobot kering terhadap bobot basah adalah:

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

$$\% \text{ bobot kering} = \frac{1970(\text{g})}{5500 \text{ (g)}} \times 100\% = 35{,}81\%$$

Maka persentase bobot kering terhadap bobot basah adalah 35,81%.

Lampiran 14. Perhitungan rendemen ekstrak etanol biji pinang (*Areca cathcu* L.)

Hasil pembuatan ekstrak maserasi biji pinang

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (% b/b)
1200	562,647	68,55

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

$$= \frac{562{,}6\ \text{g}}{1200\ \text{g}} \text{ x } 100\%$$

$$= 46{,}8\%$$

Lampiran 15. Perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari biji pinang (*Areca cathcu* L.)

Hasil fraksinasi ekstrak biji pinang

Pelarut	Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%)
n-heksana	115	1,35	1,17
Etil asetat	115	6,85	5,95
Air	115	20,89	18,17

Rendemen fraksi *n*- heksana $= \frac{\text{bobot fraksi(g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}}$ x 100%

$= \frac{1{,}35\ \text{g}}{115\ \text{g}}$ x 100%

= 1,17%

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

$= \frac{6{,}85\text{g}}{115\ \text{g}}$ x 100%

= 5,95%

Rendemen fraksi air $= \frac{\text{bobot fraksi(g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}}$ x 100%

$= \frac{20{,}89\ \text{g}}{115\ \text{g}}$ x 100%

= 18,17%

Lampiran 16. Pembuatan larutan dengan berbagai konsentrasi untuk metode difusi

1. Pembuatan larutan stok ekstrak dan fraksi konsentrasi 50%
   Ditimbang 2 gram ekstrak dan fraksi dimasukkan ke dalam vial, kemudian tambahkan DMSO 5% ad 4 mL.
2. Pembuatan larutan stok ekstrak dan fraksi konsentrasi 25%
   Ditimbang 1 gram ekstrak dan fraksi dimasukkan ke dalam vial, kemudian tambahkan DMSO 5% ad 4 mL
3. Pembuatan larutan stok ekstrak dan fraksi konsentrasi 12,5%
   Ditimbang 0,5 gram ekstrak dan fraksi dimasukkan ke dalam vial, kemudian tambahkan DMSO 5% ad 4 mL

Lampiran 17. Pembuatan larutan dengan berbagai konsentrasi

Fraksi etil asetat

Pembuatan konsentrasi 50%

Ditimbang 1 gram ekstrak dan fraksi dimasukkan ke dalam vial, kemudian tambahkan DMSO 5% ad 2 mL

No	Konsentrasi (%)	V1 (mL)	C1 (%)	V2 (mL)	C2 (%)	Keterangan
1	50	-	-	-	-	1 mL larutan stok
2	50	-	-	-	-	0,5 mL larutan stok
3	25	0,5	50	1	25	0,5 mL lar. stok + BHI ad 1mL
4	12,5	0,5	25	1	12,5	0,5 mL tabung 3 + BHI ad 1 mL
5	6,25	0,5	12,5	1	6,25	0,5 mL tabung 4 + BHI ad 1 mL
6	3,12	0,5	6,25	1	3,12	0,5 mL tabung 5 + BHI ad 1 mL
7	1,56	0,5	3,12	1	1,56	0,5 mL tabung 6 + BHI ad 1 mL
8	0,78	0,5	1,56	1	0,78	0,5 mL tabung 7 + BHI ad 1 mL
9	0,39	0,5	0,78	1	0,39	0,5 mL tabung 8 + BHI ad 1 mL
10	0,19	0,5	0,39	1	0,19	0,5 mL tabung 9 + BHI ad 1 mL
11	0,09	0,5	0,19	1	0,09	0,5 mL tabung 10 + BHI ad 1 mL

Keterangan :

Tabung 1 = Kontrol (-)

Tabung 3 = Konsentrasi 25%

$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

$V1 \cdot 50\% = 1 \cdot 25\%$

$V1 = \frac{25\%}{50\%}$

$V1 = 0{,}5$

Tabung 11 dengan konsentrasi 0,09% dipipet 0,5 mL dari tabung 10 ditambah BHI sampai 1 mL, lalu dihomogenkan dan dibuang 0,5 mL.

Tabung 12 = kontrol (+) suspensi bakteri 0,5 mL.

Tabung 2 – 11 ditambah suspensi bakteri 0,5 ml.

Lampiran 18. Formulaasi dan pembuatan media

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

Infus dari otak sapi		200,0 gram
Infus dari hati sapi		250,0 gram
Protease peptone		10,0 gram
Dektrosa		2,0 gram
NaCl		5,0 gram
Dinatrium fosfate		5,0 gram
Aquadestilata	ad	1000,0 mL
pH		7,4

Semua bahan dilarutkan dalam aquadestilata sebanyak 1000 mL diaduk sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121ºC selam 15 menit.

2. Formulasi dan pembuatan *Mac Conkey Agar* (MCA)

Peptone (Pancreatic digest of gelatin)17 gram

Proteose pepton	3 gram
Lactose monohydrate	10 gram
Bile salt	1,5 gram
Sodium chloride	5 gram
Neutral red	0,03 gram
Crystal violet	0,001 fram
Agar	13,5 gram
pH	7,1
Aquadestilata	1000 mL

Semua bahan dilarutkan dalam aquadestilata sebanyak 1000 mL dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian dituang pada tabung reaksi dan di autoklaf.

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

Beef, dehidrated infusion from 300,0 gram

Casein hydrolysate		17,5 gram
Starch		1,5 gram
Agar-agar		17,0 gram
Aquadestilata	ad	1000 mL

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

4. Formulasi dan pembuatan *Sulfida Indol Mortility* (SIM)

Pepton from casein	20 gram
Pepton from meat	6 gram
Ammonium Iron (II) citrate	0,2 gram
Sodium thiosulfate	0,2 gram
Agar-agar	0,2 gram

pH		7,3 ± 0,1
Aquadestilata	ad	1000 mL

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

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

Meat extract	3,0 gram
Yeast extract	3,0 gram
Peptone from casein	15,0 gram
Peptone from meat	5,0 gram
Lactose	10,0 gram
D(+) glucose	1,0 gram
Ammonium iron (III) citrate	0,5 gram
Sodium chloride	5,0 gram
Sodium thiosulfate	0,5 gram
Phenol red	0,024 gram
Agar-agar	12,0 gram
pH	7,4 ± 0,1
Aquadestilata ad	1000 mL

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

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

Peptone from maet	5,0 gram
Yeast extract	3,0 gram
D(+) glucose	1,0 gram
L-lysine monohydrochloride	10,0 gram
Sodium thioslfate	0,04 gram
Ammonium iron (III) citrate	0,5 gram
Bromocresol purple	0,02 gram
Agar-agar	12,5 gram
pH	6,7 ± 0,1
Aquadestilata ad	1000 mL

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

7. Formulasi dan pembuatan Citrat

Ammonium dihydrogen phosphate	1,0 gram
di-potassium hydrogen phosphate	1,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
Sodium citrate	2,0 gram
Magnesium sulfate	0,2 gram
Bromothymol blue	0,08 gram
Agar-agar	12,0 gram

pH		6,9 ± 0,1
Aquadestilata	ad	1000 mL

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