

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, FRAKSI ETIL
ASETAT, DAN FRAKSI AIR DARI EKSTRAK ETANOL KAYU
SIWAK (*Salvadora persica* L) TERHADAP
Staphylococcus aureus ATCC 25923**



Oleh:

**Achmad Raufi
18123661A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2016**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, FRAKSI ETIL
ASETAT, DAN FRAKSI AIR DARI EKSTRAK ETANOL KAYU
SIWAK (*Salvadora persica* L) TERHADAP
Staphylococcus aureus ATCC 25923**

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

Oleh :

**Achmad Raufi
18123661A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2016**

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, FRAKSI ETIL
ASETAT, DAN FRAKSI AIR DARI EKSTRAK ETANOL KAYU
SIWAK (*Salvadora persica* L.) TERHADAP
Staphylococcus aureus ATCC 25923**

Oleh

Achmad Raufi

18123661A

Dipertahankan di hadapan Panitia Pengujian Skripsi

Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi

Pada tanggal: 16 Juni 2016

Mengetahui

Fakultas Farmasi

Universitas Setia Budi

Dekan



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

Pembimbing Utama

Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt.

Pembimbing Pendamping

Dra. Nony Puspawati, M.Si.

Penguji :

1. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt.

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

3. Dra. Nony Puspawati, M.Si.

4. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt

PERSEMBAHAN

Man jadda wajada (Barangsiapa yang bersungguh-sungguh pasti akan berhasil)

Man Shabara zhafira (Barangsiapa yang bersabar pasti akan beruntung)

Man Saara ala darbi washala (Barangsiapa yang berjalan Tin jalannya pasti akan sampai)

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan (Q.S. Al-Insyirah: 5)

Skripsi ini kupersembahkan kepada:

**Bapak, Ibu, dan kedua Kakakku tersayang yang selalu memberikan
dukungannya selama ini.**

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 satu 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, 16 Juni 2016



Achmad Raufi

KATA PENGANTAR

Assalammu'alaikum Wr. Wb

Alhamdulillah robbil'allamin. Segala puji dipanjatkan kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan kita kemuliaan dan beribadah kepada-Nya, menghidupkan kita dengan Dzikir-Nya, membersihkan kita dengan syariat-Nya, membentuk kepribadian kita dengan kepribadian Islam dan atas rida-Nya pula penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, FRAKSI ETIL ASETAT, DAN FRAKSI AIR DARI EKSTRAK ETANOL KAYU SIWAK (*Salvadora persica* L) TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923”**.

Penulis menyampaikan terimakasih kepada pihak-pihak yang terlibat langsung, Khususnya kepada:

1. Djoni Tarigan, MBA. Selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
3. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt. Selaku pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, pengarahan dan dorongan semangat selama penulisan skripsi ini.
4. Dra. Nony Puspawati, M.Si. Selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, pengarahan dan dorongan semangat selama penulisan skripsi ini.
5. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt. dan D. Andang Arif Wibawa. S.P., M.Si selaku tim penguji yang telah memberikan saran dan kritik untuk perbaikan skripsi.
6. Segenap dosen Universitas Setia Budi yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan khususnya bidang farmasi.

7. Bapak, ibu dan kakak-kakakku tersayang yang selalu memberikan semangat, motivasi dan doa yang tiada akhir dan dukungan baik moril maupun materi; selama ini.
8. Rekan mahasiswa dan segenap pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penyelesaian praktek ini.

Dengan segala keterbatasan dan kekurangan yang ada, penulis yakin bahwa karya ini masih belum sempurna, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan sumbangan kritik yang membangun sebagai langkah untuk meningkatkan kualitas penulis. Sebagai akhir, penulis berharap semoga skripsi ini berguna bagi kita semua.

Wasaalammu'alaikum Wr. Wb.

Surakarta, 16 Juni 2016



Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Klasifikasi Tanaman Kayu Siwak	5
1. Sistematika tumbuhan	5
2. Morfologi tumbuhan	5
3. Khasiat kayu siwak	6
4. Kandungan kimia kayu siwak	6
B. Simplisia	8
1. Pengertian simplisia	8
2. Pengeringan simplisia	9
C. Penyarian	9

1. Ekstraksi	9
2. Perkolasi	10
3. Fraksinasi	11
4. Pelarut	11
D. Kromatografi Lapis Tipis	13
E. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1. Sistematika <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2. Morfologi dan Identifikasi	15
F. Media	16
G. Sterilisasi	17
H. Kotrimoksazol	17
I. Mekanisme kerja antibakteri	18
1. Uji aktivitas antibakteri	18
2. Metode Difusi	20
3. Metode Dilusi	20
J. Landasan Teori	21
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. Bahan dan Alat	28
1. Bahan	28
2. Alat	28
D. Jalan Penelitian	29
1. Identifikasi tumbuhan	29
2. Pengambilan bahan	29
3. Pembuatan serbuk kayu siwak	29
4. Penetapan susut pengeringan serbuk Kayu siwak	30
5. Pembuatan ekstrak etanol 70 %	30
6. Penetapan persen rendemen.....	31
7. Tes bebas etanol ekstrak kayu siwak	31
8. Fraksinasi ekstrak kayu siwak	31
9. Sterilisasi	32
10. Pembuatan suspensi bakteri uji.....	32
11. Identifikasi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	32
12. Pengujian antibakteri kayu siwak secara difusi	33
13. Pengujian antibakteri kayu siwak secara dilusi	34
14. Identifikasi kimia fraksi teraktif secara kualitatif	35
15. Identifikasi kandungan kimia fraksi teraktif secara KLT	36

16. Analisis Hasil	38
17. Skema penyarian kayu siwak.....	39
18. Skema uji aktivitas antibakteri metode difusi dan dilusi	40
 BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	44
1. Hasil identifikasi kayu siwak (<i>Salvadora Persica L</i>)	44
2. Pengambilan sampel	44
3. Pembuatan serbuk kayu siwak	44
4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk kayu siwak	45
5. Hasil pembuatan ekstrak etanol kayu siwak	45
6. Hasil uji bebas etanol ekstrak kayu siwak	46
7. Hasil fraksinasi ekstrak kayu siwak	47
8. Hasil identifikasi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	47
9. Hasil pengujian antibakteri kayu siwak secara difusi	48
10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat kayu siwak dan kotrimoksazol dengan metode dilusi	52
11. Hasil identifikasi kimia fraksi etil asetat secara kualitatif	54
12. Hasil identifikasi fraksi etil asetat secara KLT	55
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	58
A. Kesimpulan.....	58
B. Saran	58
 DAFTAR PUSTAKA	59
 LAMPIRAN	62

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema penyarian kayu siwak	39
Gambar 2. Skema uji aktivitas antibakteri	40
Gambar 3. Skema kerja pembuatan suspensi bakteri perbandingan 1:1000 ...	41
Gambar 4. Uji aktivitas antibakteri metode difusi	42
Gambar 5. Uji aktivitas antibakteri mode dilusi	43

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah kayu siwak.	45
Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk kayu siwak.	45
Tabel 3. Rendemen ekstrak etanol kayu siwak.	46
Tabel 4. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol kayu siwak	47
Tabel 5. Hasil Identifikasi bakteri uji katalase dan koagulase	48
Tabel 6. Diameter hambat uji aktivitas antibakteri secara difusi	49
Tabel 7. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat dan kotrimoksazol dengan metode dilusi	52
Tabel 8. Hasil identifikasi fraksi etil asetat secara kualitatif	58
Tabel 9. Hasil identifikasi Flavonoid secara KLT	56

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Surat keterangan melakukan identifikasi tumbuhan	64
Lampiran 2. Tumbuhan kayu siwak	65
Lampiran 3. Gambar alat	66
Lampiran 4. Hasil Ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat, air	67
Lampiran 5. Hasil identifikasi <i>Stapylococcus aureus</i> ATCC 25923	68
Lampiran 6. Hasil difusi	69
Lampiran 7. Hasil dilusi fraksi teraktif etil asetat dan kotrimoksazol	72
Lampiran 8. Foto identifikasi fraksi teraktif etil asetat secara kualitatif	78
Lampiran 9. Foto identifikasi KLT fraksi teraktif etil asetat	79
Lampiran 10. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah kayu siwak	79
Lampiran 11. Hasil penyusutan pengeringan kayu siwak	80
Lampiran 12. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat, dan air kayu siwak	80
Lampiran 13. Pembuatan larutan stok difusi dan dilusi	82
Lampiran 14. Lampiran pengujian dosis antibiotik Kotrimoksazol	84
Lampiran 15. Hasil data difusi secara ANOVA <i>one way</i>	85
Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media	99

INTISARI

Raufi Achmad, 2016, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, FRAKSI ETIL ASETAT, DAN FRAKSI AIR DARI EKSTRAK ETANOL KAYU SIWAK (*Salvadora persica* L) TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Kayu siwak (*Salvadora persica* L) mengandung zat – zat kimia yang bersifat antibakterial dan antifungal. Kandungan kimia kayu siwak adalah flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas fraksi *n*-heksan, etil asetat, air dan ekstrak etanol kayu siwak (*Salvadora persia* L) sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Fraksi teraktif dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, KHM dan KBM dari fraksi teraktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Penyarian ekstrak kayu siwak menggunakan metode perkolasi dengan pelarut 70% kemudian difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan air. Uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi dan dilusi. Konsentrasi ekstrak dan fraksi yang digunakan untuk metode difusi adalah 50%, 25% dan 12,5%. Konsentrasi untuk metode dilusi adalah 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78% dan 0,39%.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri teraktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan konsentrasi bunuh minimum 3,12%.

Kata kunci: Kayu siwak, fraksinasi, *Staphylococcus aureus*, antibakteri.

ABSTRACT

Raufi Achmad, 2016, ANTIBACTERIAL ACTIVITY FRACTION TEST *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE, AND WATER FROM THE SIWAK WOOD ETHANOL EXTRACT (*Salvadora persica* L) WOOD AGAINST *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, SKRIPSI, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Siwak Wood (*Salvadora persica* L) substances chemical that are antibacterial and antifungal. Siwak Wood Chemical constituents are flavonoid, alkaloid, saponin and tanin. The research was conducted to determine the fraction activity *n*-hexane, ethyl acetate, Water and ethanol extracts of siwak wood (*Salvadora persica* L) as antibacterial against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Fraction most activity hampered *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, KHM and KBM of fraction most activity for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

The extraction of siwak Wood using percolation method with 70% ethanol solvent, Then fractionated using the solvent *n*-hexane, ethyl acetate and water. The results of fractionation of the antibacterial activity tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Concentration of the extract and fraction used for the diffusion method was 50%, 25%, and 12,5%. Whereas the concentration for the dilution method was 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78% and 0,39%.

The results showed the extract, fraction of *n*-hexane, ethyl acetate fraction and water fraction of ethanol extract of siwak wood has antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and ethyl acetate fraction had the most effective antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with a kill minimum concentration of 3.12%.

Keywords: Siwak wood, fractionation, *Staphylococcus aureus*, antibacterial.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Masyarakat kembali memanfaatkan batu bara, tumbuhan-tumbuhan dan lain-lain. Gerakan kembali ke alam memiliki sisi positif yang ditunjukkan oleh adanya keinginan untuk menggunakan dan mengkonsumsi produk-produk alamiah yang diyakini tidak memiliki efek samping dan harganya terjangkau. Kelompok masyarakat yang jauh dari pelayanan kesehatan telah terbiasa memanfaatkan bahan kayu untuk mengobati penyakit-penyakit yang mereka derita (Yusro 2009). Karies gigi dan penyakit periodontal adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Karies gigi adalah penyakit infeksi merusak struktur gigi. Penyakit periodontal merupakan radang kronis pada gusi dan jaringan disekitar akar gigi. Kerusakan pada jaringan periodontal biasanya timbul pada saat plak bacterial terbentuk pada mahkota gigi (Abinnahi 2014). Bakteri yang paling banyak terdapat dalam saluran akar gigi yang nekrosis adalah bakteri anaerob, selain itu juga terdapat bakteri mikroaerofili, fakultatif anaerob, dan bakteri obligat anaerob (Baumgartner *et al.* 2002).

Hasil dari isolasi bakteri yang diambil dari gigi nekrosis dengan periapical pathosis menunjukkan adanya bakteri anaerob yaitu bakteri gram positif kokus (*Peptococcus* dan *Peptostreptococcus*), bakteri gram positif basil (*Lactobacilli*, *Bifidobacterium*, *Propionobacterium* dan *Eubacterium*), bakteri gram negatif kokus (*Veillonella parvula*), dan bakteri gram negatif basil (*Bacteroids* dan

Fusobacterium). Bakteri aerob seperti *Diphtheroids*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *E.coli*, *Pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) juga ditemukan pada saluran akar gigi yang mengalami nekrosis (Rani & Ashok 2012). Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 merupakan anggota flora normal kulit dan selaput lendir manusia yang dapat menyebabkan jerawat dan bisul pada kulit, pembentukan abses, serta sepsis kimia yang fatal, juga terdapat dalam saluran pernafasan dan pencernaan manusia.

Ekstrak etanol kayu siwak terhadap *Staphylococcus aureus* strain KKU-020 diameter hambat $40,67 \pm 0,88$ mm (Hesham *et al.* 2016). Ekstrak metanol kayu siwak dengan metode difusi menggunakan konsentrasi 400 mg/ml, 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml terhadap *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* (Mohamed *et al.* 2016). Ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* L) dengan KHM ditunjukkan pada konsentrasi 10 % dan KBM ditunjukkan pada konsentrasi 20 % terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Tirtaaji 2008). Penelitian kayu siwak tersebut belum menggunakan tahap fraksinasi. Kayu siwak memiliki kandungan yaitu karbohidrat, glikosid, terpenes flavonoid, tanin, alkaloid dan saponin (Mohamed *et al.* 2016). Senyawa tersebut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda-beda, flavonoid dan alkaloid semi polar, sedangkan saponin dan tanin bersifat polar sehingga digunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda pula.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka peneliti tertarik melakukan penelitian untuk menguji potensi fraksi-fraksi kayu siwak terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini perlu dilakukan untuk menguji aktivitas fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak kayu siwak terhadap *Staphylococcus aureus*. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan golongan senyawa dan menarik senyawa kimia yang mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* sesuai sifat kepolaran pelarut yang digunakan.

Metode yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas dari *Staphylococcus aureus* salah satunya menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa warna jernih yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap mikroorganisme yang diperiksa (Jawetz *et al.* 2007). Metode dilusi berguna untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan mengetahui kadar obat terendah yang dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan mikroorganisme (Bonang & Koeswardono 1982).

B. Perumusan Masalah

Pertama, apakah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari kayu siwak mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

Kedua, dari ketiga fraksi atau ekstrak etanol kayu siwak tersebut manakah yang teraktif dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

Ketiga, berapakah Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum dari fraksi teraktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan, pertama untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari kayu siwak terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Kedua, untuk mengetahui ketiga fraksi atau ekstrak etanol kayu siwak tersebut yang teraktif dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ketiga, untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum dan konsentrasi bunuh minimum dari fraksi teraktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat digunakan untuk memisahkan golongan senyawa aktif antibakteri dari ekstrak kayu siwak, diharapkan dapat memberikan sumbangan bagi ilmu pengetahuan dibidang obat tradisional dan digunakan sebagai masukan bagi masyarakat dalam upaya memanfaatkan kayu siwak (*Salvadora Persia* L) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Klasifikasi Tumbuhan Kayu Siwak

1. Sistematika tumbuhan

Taksonomi tumbuhan kayu siwak (*Salvadora persica* L) menurut Tjitroepomo (1998) adalah sebagai berikut:

Sinonim : *Salvadora persica*
Divisio : Embryophyta
Subdivisio : Spermatophyta
Classis : Dicotyledons
Ordo : Brassicales
Familia : Salvadoraceae
Marga : *Salvadora*
Species : *Salvadora persica* Linn

2. Morfologi tumbuhan

Siwak atau Miswak, merupakan bagian dari batang, akar atau ranting tumbuhan Kayu Siwak (*Salvadora persica* L) yang kebanyakan tumbuh di daerah Timur Tengah, Asia dan Afrika. Siwak berbentuk batang yang diambil dari tanaman arak (*Salvadora persica* L) yang berdiameter mulai dari 0,1 cm sampai 5 cm. Pohon arak adalah pohon yang kecil seperti belukar dengan batang yang bercabang-cabang, berdiameter lebih dari satu kaki. Jika kulitnya dikelupas, kulitnya berwarna

agak keputihan dan memiliki banyak juntaian serat. Akarnya berwarna cokelat dan bagian dalamnya berwarna putih. Aromanya seperti seledri dan rasanya agak pedas (Al-Khateeb *et al.* 1991).

3. Khasiat kayu siwak

Kayu Siwak telah lama digunakan sebagai alat untuk membersihkan mulut. Penggunaan kayu siwak sebagai alat untuk pembersih mulut menjadi suatu perubahan dari tradisional ke modern dan siwak merupakan alat pembersih mulut terbaik hingga saat ini (El-Mostehy *et al.* 2010).

4. Kandungan kimia kayu siwak

Kayu siwak mengandung tannin, saponin, flavanoida, dan alkaloid (Mohamed *et al.* 2016).

4.1. Flavonoid. Flavonoid adalah senyawa-senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon. Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai senyawa C₆-C₃-C₆, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C₆ (cincin benzene tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga-karbon (Robinson 1995).

Senyawa ini dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap dalam lapisan air setelah ekstrak ini dikocok dengan eter minyak bumi. Flavonoid merupakan senyawa fenol, warnanya berubah bila ditambah basa atau amonia, jadi senyawa ini mudah dideteksi pada kromatogram atau larutan. Flavonoid yang terdapat dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon (Harborne 1987).

Fungsi flavonoid antara lain sebagai antimikroba, antivirus, inhibitor kuat pernafasan dan sebagai antioksidan (Robinson 1995).

4.2. Saponin. Saponin adalah glikosida triterpen dan sterol dan telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan (Harborne 1987). Saponin merupakan senyawa aktif permukaan yang kuat dan menimbulkan busa bila dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolysis sel darah merah. Saponin dapat diperoleh dari beberapa tumbuhan dengan hasil yang baik, dan digunakan dalam bidang kesehatan, saponin larut dalam air dan etanol tetapi tidak larut dalam eter. Dalam larutan yang sangat encer saponin sangat beracun untuk ikan, dan tumbuhan yang mengandung saponin telah digunakan sebagai racun ikan selama beratus-ratus tahun. Senyawa ini dapat bekerja sebagai antimikroba (Robinson 1995). Penyarian saponin ini akan memberikan hasil yang lebih baik sebagai antibakteri jika menggunakan pelarut polar seperti etanol 70% (Harborne 1987).

4.3. Tanin. Tannin merupakan suatu zat kompleks yang terdapat campuran polifenol, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamakan kulit, kegunaan pada kulit adalah untuk pertahan bagi tumbuhan, membantu mengusir hewan pemangsa tumbuhan, mempunyai aktivitas antioksidan menghambat pertumbuhan tunas dan dapat mendenaturasi protein, kelarutan tannin adalah larut dalam air, tetapi tidak larut dalam pelarut organik non polar (Robinson 1995).

4.4. Alkaloid. Alkaloid adalah zat yang mengandung nitrogen biasanya dalam bentuk heteroklik dalam ikatan primer, sekunder, tersier atau kuartener bersifat

basa, mempunyai khasiat fisiologis tertentu yang jelas, umumnya berasa pahit. Steroid dan alkaloid yang dimodifikasi terdapat sebagai glikosida C-3 atau ester yang menyerupai struktur saponin dan sebagai penolak serangga serta sebagai senyawa antifungus (Robinson 1995). Alkaloid pada umumnya larut dalam pelarut lipofil, garamnya larut dalam pelarut organik (misal sebagai tartrat, sitrat) sehingga biasa diekstraksi dengan pelarut yang bersifat hidrofil misalnya campuran etanol dan air (Voigt 1995).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alam yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengelolaan apapun juga, kecuali dinyatakan lain berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dapat dibagi menjadi tiga golongan yaitu simplisia nabati, hewani dan simplisia pelican atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang dapat berupa tanaman utuh, bagian tanaman, eksudat tanaman, atau gabungan antara ketiganya. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh atau zat-zat yang berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa bahan kimia. Simplisia pelican atau mineral adalah simplisia berupa bahan pelican atau mineral adalah simplisia berupa bahan pelican atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa bahan kimia (Gunawan & Mulyani. 2004).

2. Pengeringan simplisia

Proses pengeringan simplisia terutama bertujuan untuk menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri. Proses pengeringan ini juga menghilangkan aktivitas enzim yang bisa menguraikan lebih lanjut kandungan zat aktif, memudahkan dalam hal pengelolaan proses selanjutnya (Gunawan & Mulyani 2004).

Cara pengeringan ada dua cara yaitu: pengeringan udara terbuka dan pengeringan dengan udara panas buatan. Pengeringan dengan udara terbuka dapat dilakukan dibawah sinar matahari langsung (Brotosisworo 1978).

Pengeringan yang dilakukan dengan sinar matahari langsung akan menyebabkan terjadinya penguraian bahan berkhasiat. Pelaksanaan pengaturan pengeringan ditentukan dari bentuk atau bagian bahan yang akan dikeringkan. Bagian tanaman yang tipis seperti bunga dan daun tidak perlu dipotong, sedangkan bagian yang keras seperti biji, akar, batang, kulit buah dan kayu sebaiknya dipotong terlebih dulu (Brotosisworo 1978).

C. Penyarian

1. Ekstraksi

Isolasi kandungan kimia senyawa yang sangat kompleks dengan tanaman obat umumnya diperlukan beberapa tahap proses pemisahan. Metode yang lazim digunakan adalah ekstraksi. Ekstraksi atau penyarian merupakan perpindahan zat

aktif yang semula berada didalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam cairan penyari (Depkes 1986).

Pemilihan larutan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Larutan yang baik harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah menguap, dan tidak mudah terbakar, selektif yakni hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak mempengaruhi zat berkhasiat, diperbolehkan oleh peraturan. Farmakope Indonesia menetapkan bahwa sebagai cairan penyari adalah etanol, air, dan eter (Depkes 1986).

2. Perkolasi

Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Prinsip perkolasi adalah serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat bepori. Cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat aktif sel-sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh. Gerak ke bawah disebabkan oleh kekuatan gaya beratnya sendiri dan cairan di atasnya, dikurangi dengan daya kapiler yang cenderung untuk menahan. Kekuatan yang berperan pada perkolasi antara lain: gaya berat, kekentalan, daya larut, tegangan permukaan, difusi, osmosa, adesi, daya kapiler daya gesekan (friksi). Alat yang digunakan untuk perkolasi disebut perkulator, cairan yang digunakan untuk menyari disebut cairan penyari atau menstrum, larutan zat aktif yang keluar dari perkulator disebut sari atau perkolat, sedang sisa setelah dilkawkannya penyarian disebut ampas atau sisa perkolasi (Depkes 1986).

3. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan pemisahan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran suatu senyawa. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan terlarut dalam pelarut polar, begitu pula senyawa-senyawa non polar akan terlarut dalam pelarut non polar. Mula - mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Masing-masing pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari dengan pelarut polar (Harborne 1987).

Pada fraksinasi digunakan ekstraksi cair-cair, bersifat sederhana, bersih, cepat dan mudah. Ekstraksi cair-cair merupakan suatu teknik bila mana suatu larutan dibuat bersentuhan dengan suatu pelarut kedua (biasanya organik), yang pada hakekatnya tak tercampurkan dengan pelarut pertama dan menimbulkan perpindahan satu atau lebih zat terlarut (solute) ke dalam pelarut yang kedua. Pemisahan dilakukan dapat dilakukan dengan mengocok-ngocok dalam sebuah corong pemisah selama beberapa menit (Basset J *et al.* 1994).

4. Pelarut

4.1. Etanol. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, antrakinon, flavonoid, steroid, damar, klorofil, lemak, malam tanin dan saponin hanya sedikit larut. Zat pengganggu yang larut dalam etanol hanya terbatas (Depkes 1986).

Umumnya berlaku sebagai bahan pengekstraksi dengan campuran bahan pelarut yang berlainan terutama campuran etanol air dengan etanol 70% dapat dihasilkan suatu bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengotor hanya dengan skala kecil turut dengan cairan pengekstraksi (Voight 1989).

4.2. *n*-heksan. pelarut *n*-heksan adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih terdiri dari suatu campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna atau pucat, tranparan, bersifat volatile, mudah terbakar, bau karateristik, tidak dapat larut dengan air, dapat larut dengan alkohol, benzene, kloroform, eter (Martindale 1993). Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksan, yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti terpenoid, triterpenoid dan sterol, alkaloid, dan fenil propanoid (Depkes 1986).

4.3. Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut semi polar, mudah terbakar dan menguap, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas. Etil asetat merupakan suatu cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah, larut dalam 15 bagian air, dapat bercampur dalam eter, etanol dan kloroform (Depkes 1986). Senyawa yang larut kedalam pelarut ini adalah flavonoid, alkaloid, polifenol (Harborne 1987).

4.4. Air. Air dipertimbangkan sebagai pelarut karena stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun. Dan alamiah. Air dapat menyebabkan reaksi enzimatis, yang mengakibatkan penurunan mutu, tetapi adanya air akan mempercepat proses hidorlisis. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan disamping zat aktif ikut tersari juga zat lain yang

tidak diperlukan mengganggu proses penyarian. Senyawa yang larut dalam pelarut ini adalah saponin (Depkes 1986).

D. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis adalah metode pemisahan fitokimia lapisan yang memisahkan yang terdiri atas bahan yang berbutir-butir (fase diam). Ditempatkan pada penyangga berupa alat pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita (awal). Setelah pelat atau lapisan ditaruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak). Pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan) selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (Stahl 1985).

Kromatografi lapis tipis (KLT) melibatkan dua fase diam atau sifat lapisan dan sifat fase gerak atau campuran pelarut pengembang. Fase diam dapat berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai permukaan penyerap (kromatografi cair – padat) atau berfungsi sebagai penyangga untuk lapisan zat cair (kromatografi cair - cair). Fase diam KLT sering disebut penyerap, walaupun sering berfungsi sebagai penyangga untuk lapisan zat cair di dalam sistem kromatografi cair-cair. Hampir segala macam serbuk dapat dipakai sebagai penyerap pada KLT, yaitu silika gel (asam silika), alamina (aluminium oksida), dan selulosa. Fase gerak dapat berupa hampir segala macam pelarut atau campuran pelarut. Cara deteksi bercak dapat

dilihat di bawah sinar UV 254 dan 366, dengan pereaksi semprot menggunakan pereaksi khusus untuk senyawa tertentu (Sudjadi 1986).

E. Staphylococcus aureus

1. Sistematika *Staphylococcus aureus*

Menurut Holt *et al.* (1994), sistematika *Staphylococcus aureus* sebagai berikut:

Divisio	: Protophyta
Class	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Micrococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Staphylococcus aureus merupakan flora normal pada kulit atau daerah saluran pernafasan bagian atas. Hal ini dikarenakan kulit terus-menerus berhubungan dan kontak dengan lingkungan sekitarnya, maka kulit akan cenderung mengandung mikroorganisme. *Staphylococcus aureus* berbentuk bulat, bergaris tengah 0,5 – 1,5 mikrometer, satu-satu atau berpasangan, non – motil, bersifat gram positif. Dinding sel mengandung dua komponen utama, peptidoglikan dari asam – asam teichoic. Metabolisme aerob dan anaerob. Biasanya peka terhadap antibiotika beta-laktam dan makrolida, tetrasiklin, dan kloramfenikol, tetapi resisten terhadap polimixin dan polynes. Peka terhadap fenol dan derivat-derivatnya, senyawa-

senyawa yang mempunyai aktivitas permukaan, salsilanida, karbanilida, halogen, dan peka terhadap panas, serta banyak ditemukan pada kulit, kelenjar kulit dan selaput lendir (Bonang & Koewandono 1982).

2. Morfologi dan Identifikasi

Staphylococcus aureus adalah bakteri berbentuk bola dengan diameter kira-kira 1µl, biasanya hidup bergerombol seperti buah anggur. Biakan cair juga terlihat kokus yang tunggal, berpasangan, tetrad, atau berbentuk rantai. Kokus muda bersifat Gram Positif, pada biakan tua banyak sel menjadi Gram Negatif. *Staphylococcus aureus* tidak bergerak dan tidak membentuk spora (Jawetz *et al.* 1986).

Staphylococcus aureus mudah tumbuh pada perbenihan bakteriologik dalam keadaan aerobik atau mikro-aerobik. *Staphylococcus aureus* tumbuh paling cepat pada 37⁰C tetapi paling baik membentuk pigmen pada suhu kamar. Koloni pada perbenihan bulat, halus, menonjol, dan berkilau-kilauan, membentuk pigmen. *Staphylococcus aureus* berwarna kuning emas (Jawetz *et al.* 1986).

Staphylococcus aureus dapat meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik sangat bervariasi, tetapi katalase dihasilkan secara tetap. *Staphylococcus aureus* relatif resisten terhadap pengeringan, terhadap panas (bakteri ini tahan 50⁰C selama 30 menit). *Staphylococcus aureus* berbeda-beda kepekaannya terhadap sulfonamide dan antibiotika, dan mutan yang resisten terhadap obat ditemukan pada kebanyakan strain. Banyak strain resistensi terhadap penisilin karena membentuk

penisilinase beta-laktamase), suatu enzim yang merusak penisilin dengan memecah cincin beta-laktam. Pembentukannya diatur oleh plasmid yang dapat dipindahkan oleh bakteriofage (transduksi). Plasmid juga membawa kontrol genetik resistensi terhadap antibiotika lainnya, misalnya tetrasiklin dan eritromisin (Jawtez *et al.* 1986).

F. Media

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

Konsistensi media lempeng agar dapat dibuat dengan hormon-hormon tergantung pada keperluannya. Media cair dapat digunakan untuk berbagai keperluan seperti pembiakan organisme dalam jumlah besar, fermentasi dan berbagai uji. Media padat biasanya digunakan untuk penampilan atau morfologi koloni serta mengisolasi biakan murni. Media setengah padat digunakan untuk menguji adanya motilitas dan kemampuan fermentasi (Suriawiria 1985).

G. Sterilisasi

Bahan yang digunakan dalam bidang mikrobiologi harus steril, artinya bahan atau peralatan tersebut bebas dari mikroba, baik dalam bentuk vegetatif maupun spora. Tindakan sterilisasi yang dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu dengan pemanasan, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu memakai bahan kimia misal dengan penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu dengan penggunaan saringan atau filter dengan pori-pori halus sehingga dapat menahan bakteri (Suryono 1995).

H. Kotrimoksazol

Kotrimoksazol digunakan sebagai kontrol positif. Kotrimoksazol merupakan kombinasi trimethoprim dan sulfametoksazol yang menghambat reaksi enzimatik obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi kedua obat memberikan efek sinergi. Penemuan sediaan kombinasi ini merupakan kemajuan penting dalam usaha meningkatkan efektifitas klinik antimikroba (Ganiswara 1995).

Spektrum antibakteri trimetropin sama dengan sulfametoksazol, meskipun daya antibakterinya 20-100 kali lebih kuat dari pada sulfametoksazol. Mikroba yang peka terhadap kombinasi trimetropin-sulfametoksazol salah satunya adalah *Staphylococcus aureus*. Kedua komponen memperlihatkan interaksi sinergistik. Kombinasi ini mungkin efektif walaupun mikroba telah resisten terhadap

sulfonamide dan agak resisten terhadap trimetropin. Sinergisme maksimum akan terjadi bila mikroba peka terhadap kedua komponen. Frekuensi terjadinya resistensi terhadap kotrimoksazol lebih rendah dari pada masing-masing obat, karena mikroba yang resisten terhadap salah satu komponen lebih peka terhadap komponen lainnya. Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap trimetropim ditentukan oleh gen kromosom bulat plasmid. Resistensi terhadap bentuk kombinasi juga terjadi *in vivo*. Prevalensi resisten *Staphylococcus aureus* terhadap kotrimoksazol meningkat pada saat diberi pengobatan dengan sediaan kombinasi tersebut (Ganiswara 1995).

I. Mekanisme Kerja Antibakteri

Antibakteri memiliki pengertian sebagai zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba yang merugikan. Mekanisme kerja dari senyawa antibakteri diantaranya yaitu menghambat sintesis dinding sel, menghambat ketahanan permeabilitas dinding sel bakteri, menghambat kerja enzim, dan menghambat sintesis asam nukleat dan protein (Jawetz *et al.* 1986).

1. Uji aktivitas antibakteri

1.1. Penghambatan metabolisme sel bakteri. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam Para Aminobenzoat Acid (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikuti sertakan dalam

pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional, sehingga kebutuhan akan asam folat tidak terpenuhi hal ini bisa menyebabkan bakteri mati (Ganiswara 1995).

1.2. Penghambatan sintesis dinding sel. Dinding bakteri terdiri dari polipeptidiglikon. Polipeptidiglikon yaitu suatu kompleks polimer glikopeptida. Salah satu kerja antibakteri adalah menghambat sintesis dinding sel. Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Ganiswara 1995).

1.3. Perubahan permeabilitas membran sel bakteri. Selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Salah satu kerja antibakteri adalah mengubah tegangan permukaan sehingga merusak permeabilitas selektif dari membran sel mikroba. Kerusakan membrane sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Ganiswara 1995).

1.4. Penghambatan sintesis protein sel bakteri. Untuk kehidupannya, bakteri perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada waktu sintesis protein, akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan non fungsional bagi sel mikroba (Ganiswara 1995)

1.5. Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri. DNA, RNA dan protein memegang peranan penting dalam kehidupan normal sel. Salah satu kerja antibakteri yang lain adalah mekanisme berikutan dengan enzim polymerase RNA oleh enzim tersebut (Ganiswara 1995).

2. Metode difusi

Metode difusi adalah suatu uji aktifitas dengan menggunakan cakram yang berlingkang atau suatu silinder tidak beralas yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada permukaan padat yang telah ditanami dengan biakan bakteri yang akan diperiksa. Setelah inkubasi, garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri yang diperiksa. Metode ini zat yang akan ditentukan aktivitas antimikrobanya berdifusi pada lempeng agar Muller Hinton yang telah ditanami mikroba yang akan diuji. Dasar penggunaannya adalah terbentuk atau tidaknya zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekeliling cakram atau silinder yang berisi zat antimikroba (Harminta 2004).

3. Metode dilusi.

Metode dilusi dilakukan dengan mencampur secara homogen suatu obat dalam media dengan jumlah yang berbeda-beda atau membuat larutan obat dengan kadar yang berbeda-beda, masing-masing media ditambahkan suspensi kuman kemudian diinkubasi dan diamati daerah media yang jernih (Bonang & Koeswardono 1982). Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap pada media cair maupun padat. Media diinokulasikan

terhadap bakteri uji, selanjutnya diinkubasi dan diamati konsentrasi antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji. Keuntungan metode ini adalah memberikan hasil kualitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al.* 1986).

J. Landasan Teori

Kayu siwak (*Salvadora persica* L) merupakan tumbuhan berfamili *Salvadoraceae* yang umumnya digunakan sebagai bahan pembersih gigi dan efektif untuk mengurangi plak pada gigi tanpa menyebabkan luka pada gigi (Zaenab *et al.* 2004, Salehi *et al.* 2006). Kayu Siwak tidak hanya membersihkan gigi, tetapi juga memiliki daya antibakteri terhadap beberapa bakteri penyebab penyakit gigi (Zaenab *et al.* 2004). Penelitian tentang efek antibakteri siwak terhadap mikroba patogen menyebutkan bahwa pada siwak yang telah diekstrak mengandung karbohidrat, glikosid, sterol, terpenes flavonoid, tannin, alkaloid dan saponin (Mohamed *et al.* 2016).

Penelitian sebelumnya Ekstrak etanol kayu siwak terhadap *Staphylococcus aureus* strain KKU-020 diameter hambat $40,67 \pm 0,88$ mm (Hesham *et al.* 2016). Ekstrak metanol kayu siwak dengan metode difusi menggunakan konsentrasi 400 mg/ml, 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml terhadap *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* (Mohamed *et al.* 2016). Ekstrak kayu siwak

(*Salvadora persica* L) dengan konsentrasi hambat minimal ditunjukkan pada konsentrasi 10 % dan konsentrasi bunuh minimal ditunjukkan pada konsentrasi 20 % terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Tirtaaji 2008). Penelitian kayu siwak tersebut belum menggunakan tahap fraksinasi. Alkaloid merupakan senyawa aktif antimikroba dalam kayu siwak (Prasad *et al.* 2011).

Fraksinasi adalah suatu cara pemisahan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran suatu senyawa (Harbone 1987). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol, *n*-heksan, etil asetat, dan air. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, antraknon, flavonoid, steroid, damar, klorofil, lemak, malam tanin dan saponin hanya sedikit larut. Zat pengganggu yang larut dalam etanol hanya terbatas (Depkes 1986). Etanol 70% dapat dihasilkan suatu bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengotor hanya dengan skala kecil turut dengan cairan pengekstraksi (Voight 1989). Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksan yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti lemak dan asam lemak tinggi, steroid, terpenoid, triterpenoid, dan karotenoid (Depkes 1987). Etil asetat merupakan pelarut semi polar dan senyawa yang dapat larut dalam pelarut ini adalah golongan alkaloid, flavonoid dan polifenol (Harborne 1987). Air adalah pelarut polar dan senyawa yang dapat larut dalam air yaitu garam alkaloid, tanin, saponin, gula, gom, pati, protein, enzim, zat warna dan asam organik (Depkes 1986).

Staphylococcus aureus mudah tumbuh pada pembenihan bakterologik dalam keadaan aerobik dan mikro-aerobik. *Staphylococcus aureus* tumbuh paling cepat pada 37°C, tetapi paling baik membentuk pigmen pada suhu 20 °C. Koloni pada lempeng agar berbentuk bulat, halus, menonjol dan berkilau-kilauan, membentuk berbagai pigmen. Pigmen yang dihasilkan *Staphylococcus aureus* berwarna kuning emas (Jawetz *et al.* 1986).

Pemberiaan antibakteri bertujuan untuk menghentikan dan mencegah penyebaran dari bakteri penyebab infeksi. Mekanisme penghambatan antijamur antara lain penghambatan metabolisme sel bakteri, penghambatan sintesis dinding sel, perubahan permeabilitas membran sel bakteri, penghambatan sintesis protein sel bakteri, dan penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri (Ganiswara 1995).

Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas *Staphylococcus aureus* adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa warna jernih yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap mikroba yang diperiksa (Jawetz *et al.* 2007). Sebagai kontrol positif dalam penelitian ini dapat digunakan Kotrimoksazol merupakan kombinasi trimethoprim dan sulfametoksazol yang menghambat reaksi enzimatik obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi kedua obat memberikan efek sinergi (Ganiswara 1995). Metode dilusi berguna untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan mengetahui kadar obat terendah yang

dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan mikroba (Bonang & Koeswardono 1982).

K. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori dalam penelitian ini, ditarik hipotesis antara lain :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari kayu siwak mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Kedua, dari ketiga fraksi atau ekstrak etanol yang mempunyai aktivitas teraktif dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yaitu fraksi etil asetat.

Ketiga, dapat menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif ekstrak kayu siwak terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu siwak (*Salvadora persica* L) yang diambil dari Toko Sultan jalan Kapten Mulyadi, Surakarta, Jawa tengah. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu siwak yang sudah dipotong-potong dibersihkan, mempunyai ciri – ciri besarnya bervariasi dari berdiameter 0,1 – 5 cm, batang bewarna coklat muda.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah serbuk kayu siwak yang dibuat ekstrak pelarut etanol 70% dilanjutkan dengan fraksinasi yang menggunakan *n*-heksan, etil asetat, dan air.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antiakteri ekstrak etanol dengan perkolasi, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan fraksi air kayu siwak terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi terdahulu dapat diklasifikasi ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah yang sengaja divariasikan untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dapat diulangi oleh penelitian lain secara tepat. Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air kayu siwak (*Salvadora persica* L) yang diperoleh dari ekstraksi dengan cara perkolasi dengan etanol 70% dan fraksinasi dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan air dengan berbagai konsentrasi.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang dipengaruhi oleh fraksinasi kayu siwak yang dilihat dari kekeruhan media uji dan pertumbuhannya pada media selektif.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kondisi laboratorium (meliputi: Kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril) media yang digunakan dalam penelitian, tempat tumbuh tanaman, waktu panen, dan metode perkolasi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, kayu siwak (*Salvadora persica* L) yang diambil dari Toko Sultan jalan Kapten Mulyadi, Surakarta, Jawa tengah.

Kedua, serbuk kayu siwak adalah kayu siwak dikeringkan dalam alat pengering (oven) pada suhu 40°C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak perkolasi adalah hasil ekstraksi kayu siwak dengan penyari etanol 70% menggunakan proses perkolasi kemudian dipekatkan dengan evaporator dan dilanjutkan dengan fraksinasi.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah ekstrak kayu siwak yang ditambah air kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan.

Kelima, fraksi etil asetat didapat dari residu ekstrak kayu siwak dengan *n*-heksan yang kemudian difraksinasi dengan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air dari kayu siwak adalah residu dari fraksinasi fraksi etil asetat.

Ketujuh, bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi yaitu mengukur luas daerah hambatan yaitu daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri. Kontrol negatif adalah aquadest steril dan kontrol positif antibiotik kotrimiksazol. Metode dilusi yaitu berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi dengan cara penapisan hingga konsentrasi akhir sebagai berikut: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%, 0,78125%, 0,390625%.

Kontrol negatif adalah antibiotik kotrimiksazol dan kontrol positif adalah suspensi bakteri.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu siwak (*Salvadora persica* L) yang sudah dibersihkan, berbentuk batangan dan bewarna coklat muda.

1.2. Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.3. Medium. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Vogel Johnson Agar* (VJA), media ini digunakan untuk menangkap atau menumbuhkan bakteri. BHI (*Brain Heart Infusion*). Reagen untuk pengecatan Gram, larutan kristal violet (Gram A), lugol iodine (Gram B), etanol 70% - aseton (Gram C), safranin (Gram D), dan minyak imersi dan xylol pada penggunaan mikroskop.

1.4. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, *n*-heksan, etil asetat, aquadest steril, HCl, FeCl₃, H₂SO₄ pekat, Mg, kalium tellurit.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven dengan suhu rendah dan konstan, alat penyerbuk, moisture balance, timbangan analitik, mikropipet, evaporator alat perkolasi meliputi bejana silinder, perkolator, corong, erlenmeyer, botol cairan penyari, keran, tutup karet, gabus bertoreh, kertas saring, dan botol perkolat. Alat gelas lain yang digunakan seperti gelas ukur, batang pengaduk,

tabung reaksi, cawan penguap, corong pisah, alat untuk uji kualitatif seperti tabung reaksi.

Alat uji aktivitas antibakteri digunakan adalah autoklaf, inkubator, inkas, jarum ose, tabung reaksi, oven, lampu spiritus, kapas lidi steril, beaker glass, pipet ukur, pinset, dan cawan petri.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi tumbuhan

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel Kayu siwak (*Salvadora persica* L), dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tumbuhan kayu siwak yang dibuktikan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

2. Pengambilan bahan

Kayu siwak (*Salvadora persica* L) yang diambil dari kampung arab, Solo, Jawa tengah.

3. Pembuatan serbuk kayu siwak

Pembuatan serbuk Kayu siwak (*Salvadora persica* L) adalah dengan cara dikeringkan dan dioven pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$, setelah kering segera diserbuk dengan mesin penyerbuk kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga didapatkan serbuk kayu siwak (*Salvadora persica* L) yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen. Penyerbukan ini bertujuan agar luas permukaan partikel bahan yang

kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sehingga penyarian dapat langsung secara efektif.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk kayu siwak

Penetapan susut pengeringan serbuk kayu siwak (*Salvadora persica* L) digunakan menggunakan alat *Moisture balance*. Suhu atau temperatur diatur yaitu sebesar 115°C dan waktu pengeringan secara manual yaitu selama 15 menit kemudian dimasukkan neraca timbang dengan posisi 0,00 maka sampel serbuk kayu siwak sebanyak 2 g dimasukkan. Kemudian ditunggu sampai alat berbunyi, menandakan hasil analisa telah selesai. Kadar air memenuhi syarat dimana kadar air suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%, Karen dengan kadar air kurang dari 10 % sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tumbuh sehingga bahan lebih awet (Katno *et al.* 2008)

5. Pembuatan ekstrak etanol 70%

Kayu siwak (*Salvadora persica* L) diserbukkan ditimbang 2 kg. Serbuk dibasahi etanol 70% dengan perbandingan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok dengan 2,5 bagian cairan penyari sampai terbasahi semua, kemudian dimasukkan ke dalam bejana tertutup sekurang-kurangnya selama 1 jam. Massa dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam perkolator sambil sekali ditekan hati-hati, dituangi dengan pelarut secukupnya sampai cairan mulai menetes dan di atas simplisia masih terdapat selapis cairan penyari. Perkolator ditutup dan dibiarkan menetes dengan kecepatan 1 tetes per 3 detik selama 24 jam. Kran dibuka dan dibiarkan cairan penyari menetes berulang-ulang sehingga selalu terdapat

selapis cairan penyari diatas simplisia. Perkolasi dihentikan setelah cairan mulai menetes tidak berwarna. Hasil perkolasi ditampung dan diuapkan di evaporator pada suhu 40-50°C.

6. Penetapan persen rendemen

Persen rendemen diperoleh dari menimbang hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk kayu siwak kering dan dikalikan 100%

$$\%Rendemen = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{berat serbuk Kayu siwak (*Salvadora persica*)}}$$

7. Tes bebas etanol ekstrak Kayu siwak

Ekstrak kayu siwak bebas etanol dilakukan dan dibuktikan di Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Ekstrak diuji etanolnya untuk mengetahui apakah ekstrak Kayu siwak (*Salvadora persica* L) benar-benar bebas dari etanol. Ekstrak kayu siwak diuji etanolnya dengan melakukan uji esterifikasi etanol menggunakan reagen H₂SO₄ pekat (Asama Sulfat pekat) dan CH₃COOH kemudian dipanaskan, hasil uji bebas etanol dalam ekstrak kayu siwak ditandai dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

8. Fraksinasi ekstrak kayu siwak

Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang 25 gram ekstrak kayu siwak kemudian dilarutkan dengan pelarut air 75 ml, difraksi 3 kali dengan pelarut *n*-heksan masing-masing 75 ml, dalam proses fraksinasi dengan corong pisah, fase *n*-heksan terletak di atas dan fase air terletak di bawah. Fraksi *n*-heksan yang didapat dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 40°C. Residu yang didapat

dari fraksi *n*-heksan dilanjutkan fraksinasi 3 kali dengan pelarut etil asetat masing-masing 75 ml. Hasil yang didapat adalah fraksi etil asetat yang terletak di atas dan fraksi air dibagian bawah kemudian dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 40-50°C sedangkan fraksi air dipekatkan dalam penangas air.

9. Sterilisasi

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan oven pada suhu 170°-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanas api langsung sterilisasi inkas menggunakan formalin (Suriawiria 1985).

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diambil dari suatu biakan murni pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) diambil kurang lebih 2 ose dan ditanam dalam tabung yang berisi 5 ml media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan modifikasi Mc farland , kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

11. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

11.1. Identifikasi bakteri dengan cawan gores. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasi pada media differensial *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah ditetesi 3 tetes kalium telurit 1% dalam cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian yaitu beberapa koloni dengan warna hitam, sebab *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat mereduksi telurit

menjadi metalik warna medium disekitar koloni berwarna kuning karena fermentasi manitol.

11.2. Pewarnaan. Pewarnaan Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan Gram A (cat Kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordan), Gram C (etanol:aseton=1:1 sebagai peluntur) Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup). Bakteri dinyatakan positif apabila berwarna ungu dibawah mikroskop.

11.3. Identifikasi biokimia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan koagulase. Uji katalase dapat dibuat dengan cara mencampurkan 0,5 ml hydrogen peroksida 3 % dengan 1 ose bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil positif akan terbentuk gelembung udara atau buih (Depkes 1994).

Uji koagulase dapat dilakukan dengan cara menyiapkan plasma kelinci dan asam sitrat yang telah diencerkan 1:5 ditambah 1 ose biakan bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-4 jam. Hasilnya positif jika tabung uji dibalik, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung.

12. Pengujian antibakteri kayu siwak secara difusi

Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari kayu siwak (*Salvadora persica* L) yang diperoleh diuji secara mikrobiologi dengan bakteri *Staphylococcus aureus*. Pengujian daya antibakteri dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi. Metode yang digunakan yaitu difusi dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat

kemudian diinokulasikan ke dalam medium MHA dengan metode perataan (*Spread Plate Method*) dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Pada media tersebut dibuat 5 sumuran dengan boor drop dengan jarak yang sama. Masing-masing sumuran diisi fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, kotrimoksazol sebagai kontrol positif dan aquadest steril sebagai kontrol negatif dengan menggunakan pipet dropper. Konsentrasi fraksi dalam tiap petri masing-masing 50%, 25%, 12,5%, Pembuatan konsentrasi fraksi *n*-heksan dan etil asetat menggunakan pelarut DMSO 1%, sedangkan fraksi air dilarutkan dalam aquadest steril. 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 disekitar sumuran menandakan bahwa kandungan kimia kayu siwak memiliki daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus*. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

13. Pengujian antibakteri kayu siwak secara dilusi

Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 10 tabung steril. Pembuatan larutan stok ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan dan etil asetat menggunakan pelarut DMSO 1%, sedangkan fraksi air dilarutkan dalam aquadest steril, masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa konsentrasi pengenceran yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%, 0,78125%, 0,390625%. Medium BHI dimasukkan 0,5 ml ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptis, tabung pertama (control negative) kedua ditambahkan 0,5 ml larutan stok lalu dikocok

kemudian dari tabung kedua diambil 0,5 ml dimasukkan kedalam tabung ketiga dan begitu seterusnya sampai tabung kesembilan. Suspensi bakteri dalam medium BHI dimasukkan kedalam tiap-tiap tabung uji sebanyak 0,5 ml kecuali tabung pertama. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) yaitu batas terendah tabung media yang jernih atau yang memberikan hasil negatif. Kemudian menentukan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dengan cara menginokulasi sediaan dari tabung uji pada media differensial *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah ditetesi 3 tetes kalium telurit 1% dalam cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

14. Identifikasi kimia fraksi teraktif secara kualitatif

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat pada kayu siwak.

14.1. Identifikasi saponin. Masukan fraksi teraktif ekstrak etanol kayu siwak ke dalam tabung reaksi, tambahkan 10 ml air panas, dinginkan dan kemudian kocok kuat-kuat selama 10 detik (jika zat yang diperiksa berupa sediaan cair, encerkan 1ml sediaan yang diperiksa dengan 10 ml air dan kocok kuat-kuat selama 10 detik). Positif bila terbentuk buih yang mantab selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes asam klorida 2N, buih tidak hilang (Depkes 1980).

14.2. Identifikasi Flavonoid. Masukkan fraksi teraktif ekstrak etanol kayu siwak ditambah 5 ml aquadest dipanaskan selama 1 menit, disaring dan diambil filtratnya. Filtrat ditambah 0,1 gram serbuk Mg, 2 ml larutan alkohol : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran ini dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah / kuning / jingga pada amil alkohol (Depkes 1980).

14.3. Identifikasi alkaloid. Masukkan fraksi teraktif ekstrak etanol kayu siwak ditambah dengan sedikit larutan HCl 2 N, panaskan kemudian ditambahkan larutan Mayer terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dan dengan dragendorff terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, maka ada kemungkinan terdapat alkaloid (Depkes 1977).

14.4. Identifikasi Tanin. Masukkan fraksi teraktif 2 mg dididihkan dalam 20 ml air lalu disaring. Filtrate ditambahkan FeCl_3 1%, vortek hingga mengalami perubahan warna. Sampel dinyatakan positif apabila mengalami perubahan warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Depkes 1980)

15. Identifikasi kandungan kimia fraksi teraktif secara KLT

Fraksi yang paling aktif diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi yang dinyatakan paling aktif ditotolkan menggunakan pipa kapiler diatas lempeng kromatografi kemudian dielusikan dengan jarak pengembang 5 cm. KLT mula-mula dilakukan dengan cara menaikkan cairan pengembang (fase gerak) di dalam suatu bejana (chamber) yang dindingnya telah dilapisi dengan kertas saring sehingga atmosfer di dalam bejana dijenuhi dengan fase gerak kemudian dilakukan

elusi sampai fase gerak mencapai batas elusi. Setelah pengembangan, lempeng kromatografi lapis tipis dikeringkan, dilakukan deteksi di bawah sinar UV dan pereaksi lainnya. Bercak yang dideteksi ditentukan harga Rf dan penampakan warnanya. Fase diam menggunakan lempeng KLT, lempeng yang digunakan lempeng silika gel GF₂₅₄ dengan ukuran 10 x 10 cm. Lempeng berupa lempeng kaca atau lempeng lain yang cocok.

15.1. Identifikasi Saponin. Fase gerak yang digunakan Kloroform-metanol-air (6:3:1). Setelah lempeng kromatografi berada 30 menit dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan, suhu 20°C harus tetap terjaga. Suhu yang lebih tinggi, maka semua bercak akan berpindah kedaerah Rf yang lebih atas. Peraksi penampak yang digunakan anisaldehyd-asam sulfat pekat. Pereaksi ini saponin membentuk bercak biru, violet biru atau kadang-kadang kekuningan bila diamati pada sinar biasa (Harborne 1987).

15.2. Identifikasi Flavonoid. Fase gerak yang digunakan kloroform : metanol (1:1) dengan pereaksi semprot sitroborat. Bila dengan UV 254 nm memberikan peredaman, UV 366 nm berflouresensi biru, kuning, ungu gelap (Harborne 1987).

15.3. Identifikasi Alkaloid. Fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya umenggunakan toluene : etil asetat : dietilamin (7:2:1). Pereaksi semprot yang digunakan dragendrof. Akan terlihat bercak berwarna jingga sampai merah tua (Harborne 1987).

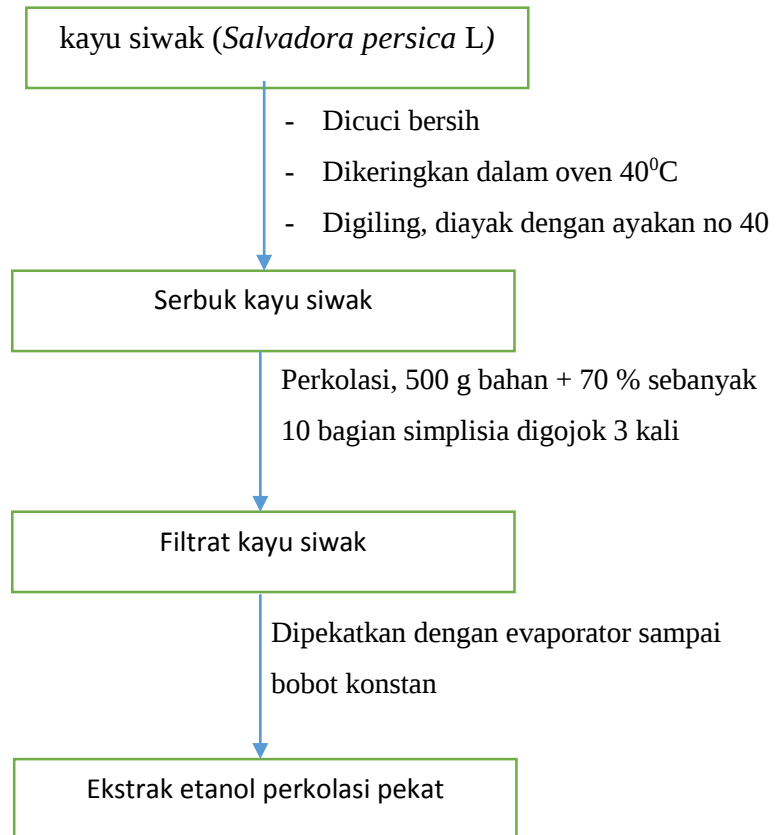
15.4. Identifikasi Tanin. Untuk mengetahui adanya tanin maka perlu dilakukan identifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya yang digunakan adalah *n*-heksan : etil asetat (3 : 7). Dideteksi di bawah sinar UV 254 berwarna gelap dan UV 366 biru hitam. Pereaksi semprot yang digunakan FeCl₃ 1% (Robinson 1995).

16. Analisis Hasil

Analisis data yang diperoleh dari uji aktivitas fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dari ekstrak etanol kayu siwak (*Salvadora persica* L), serta kontrol positif dan kontrol negatif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan metode difusi secara statistik dengan Analisis of Varians (ANOVA) satu jalan dengan menggunakan software SPSS 18. Analisa data dengan statistik dilakukan untuk mengetahui beda nyata atau tidak diameter hambat antara fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dari ekstrak etanol kayu siwak dalam berbagai konsentrasi serta kontrol positif dan kontrol negatif.

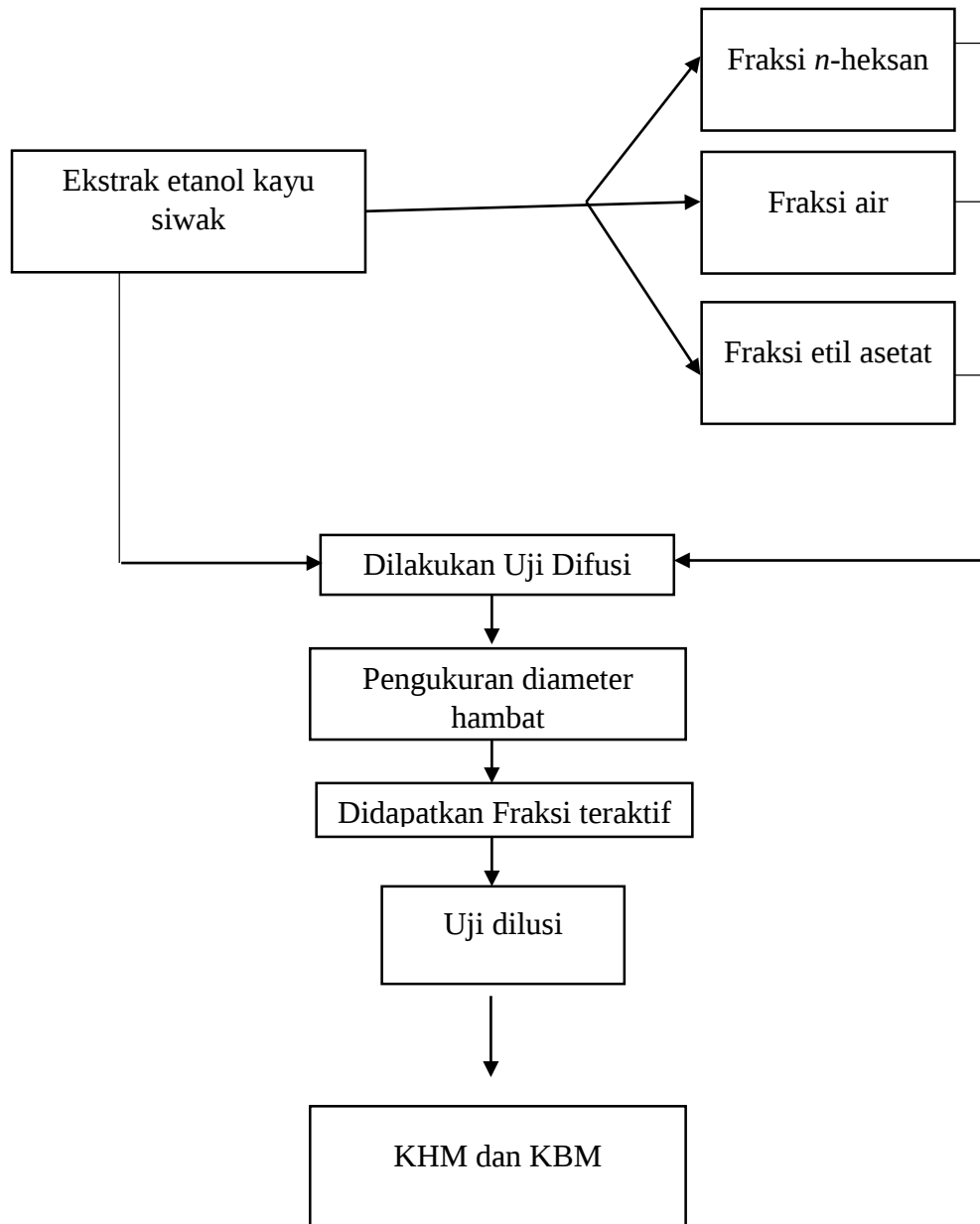
17. Skema penyarian kayu siwak

Sistematis skema penyarian kayu siwak, dapat dilihat pada gambar dibawah ini.

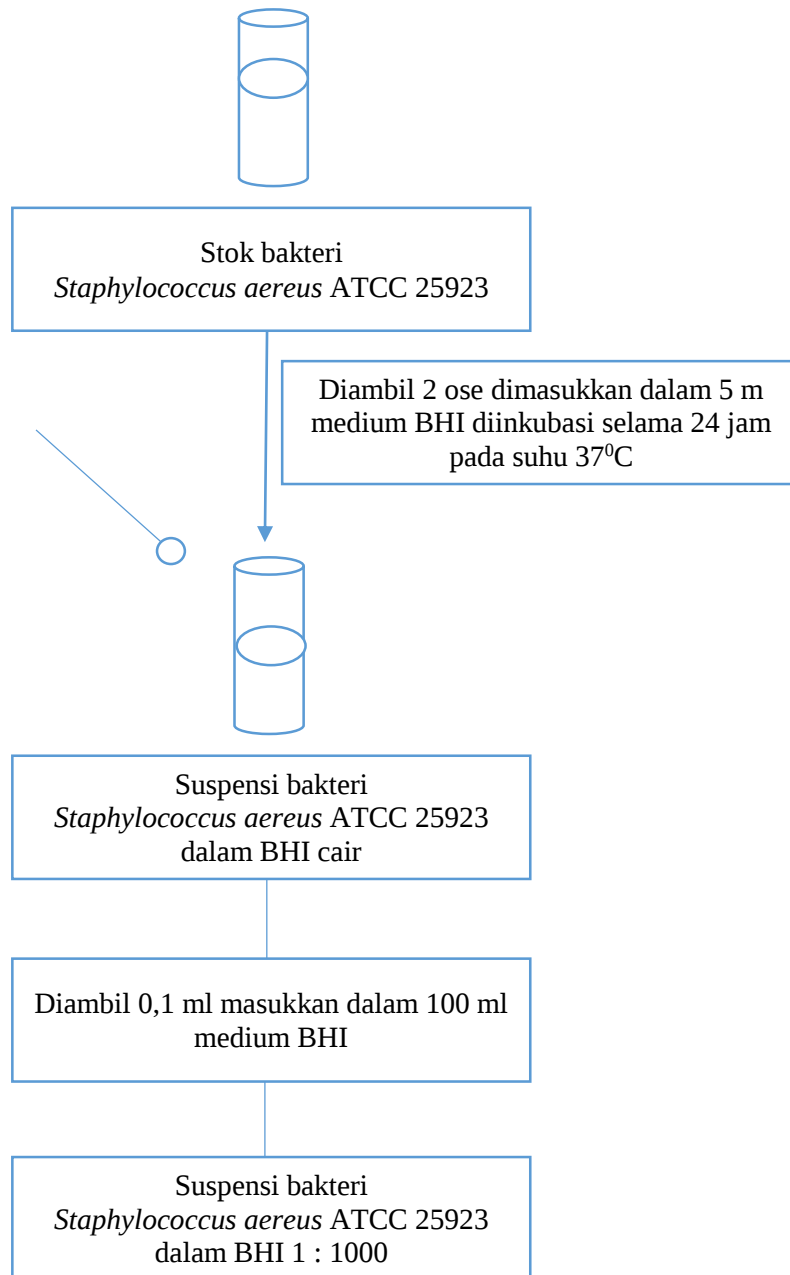


Gambar 1. skema penyarian kayu siwak

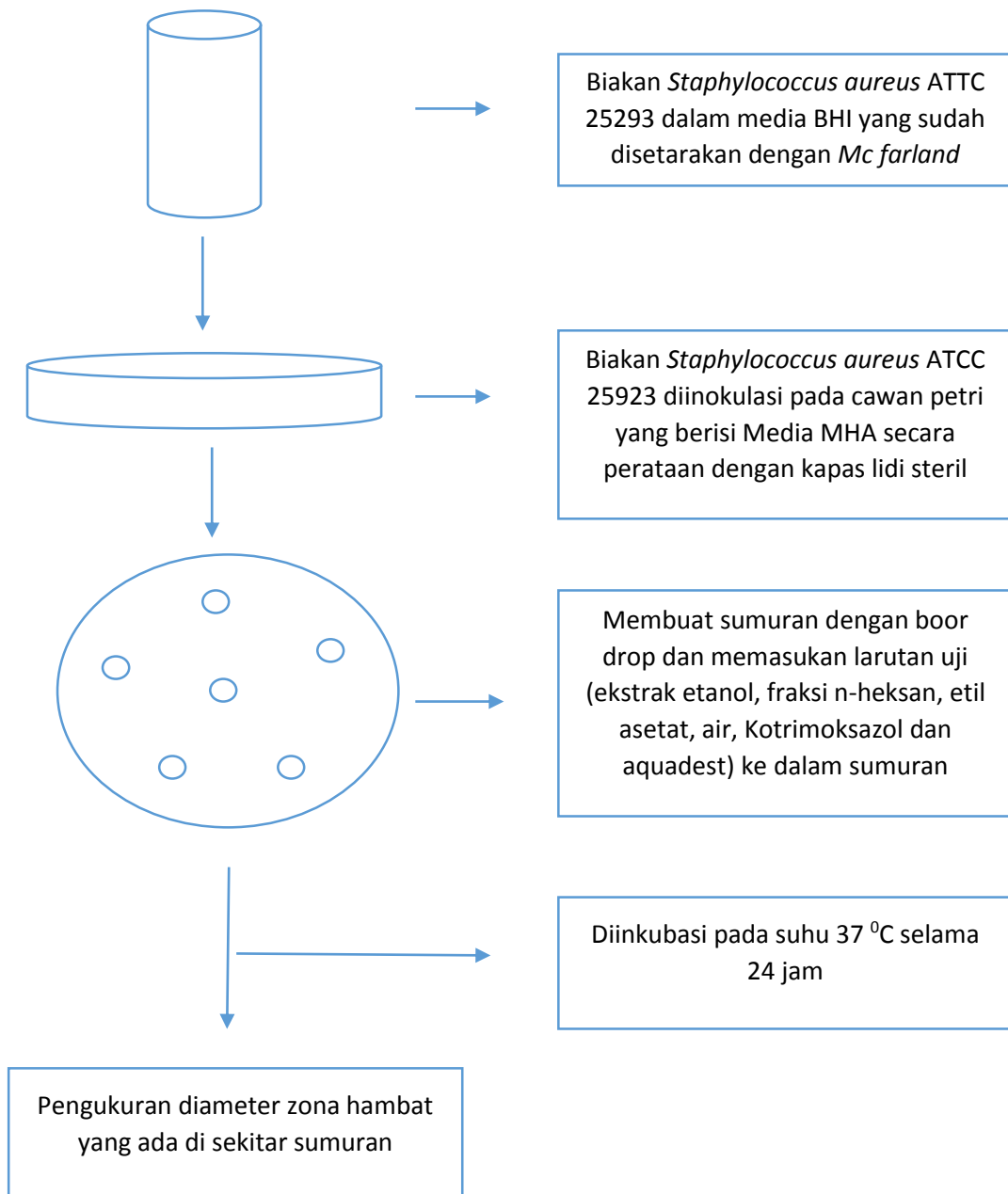
18. Skema Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dan dilusi



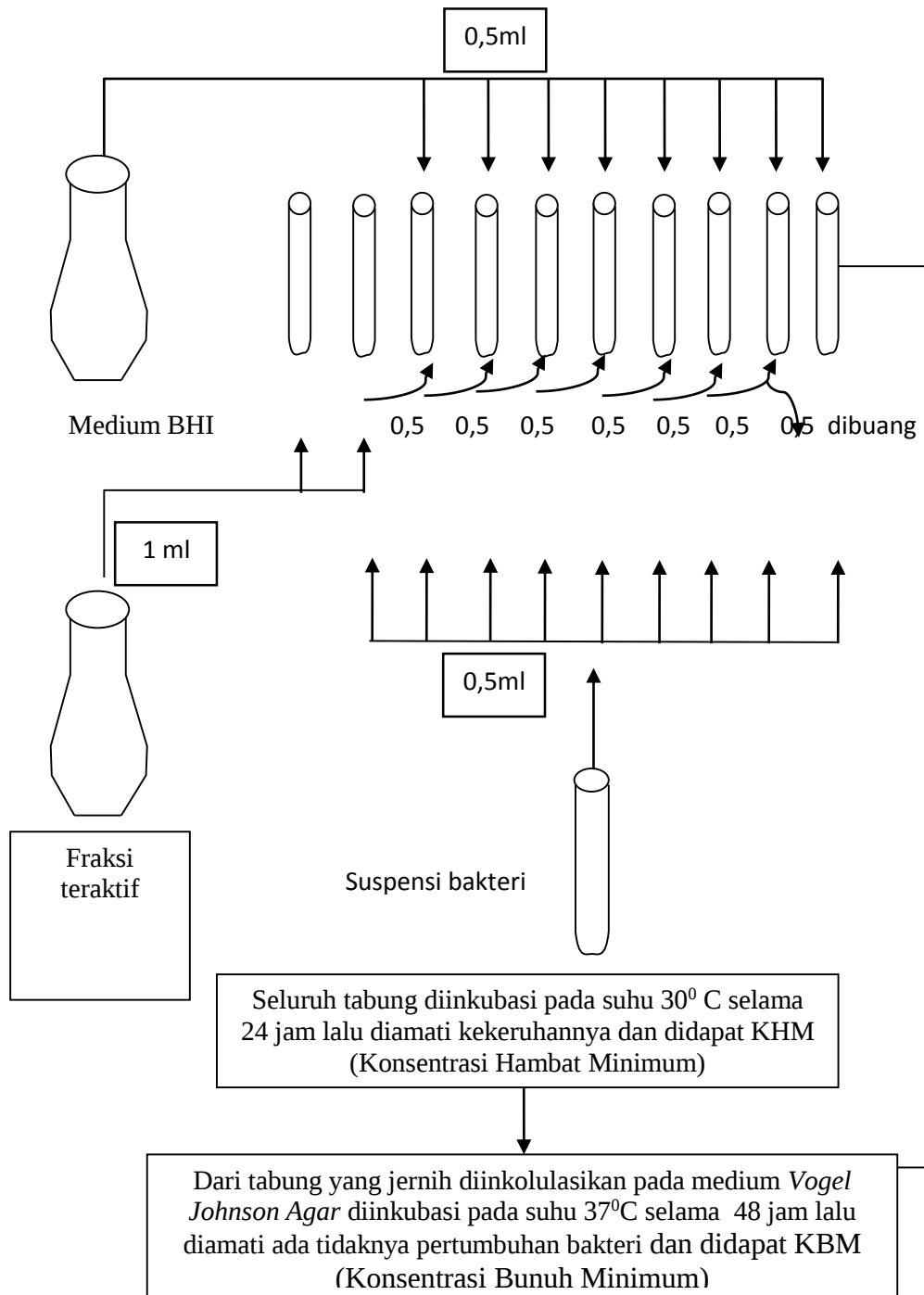
Gambar 2. Skema uji aktivitas antibakteri



Gambar 3. Skema kerja pembuatan suspensi bakteri dengan perbandingan 1 : 1000



Gambar 4. Uji aktivitas antibakteri Metode Difusi



Gambar 5. Uji aktivitas antibakteri metode dilusi

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Hasil identifikasi kayu siwak (*Salvadora persica* L)

Bedasarkan hasil identifikasi kayu siwak dilakukan di Departemen Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar kayu siwak (*Salvadora persica* L). Identifikasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan digunakan sebagai objek penelitian dengan cara mencocokkan ciri-ciri tanaman yang tercantum dalam literatur, untuk menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan dan menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain.

2. Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu siwak (*Salvadora persica* L) yang diambil dari Toko Sultan Jalan Kapten Mulyadi, Surakarta, Jawa Tengah pada bulan Januari 2016.

3. Pembuatan serbuk kayu siwak

Kayu siwak yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir sampai terbebas dari butiran debu. Kayu siwak dikeringkan dengan menggunakan oven. Proses pengeringan dimaksudkan mengurangi kadar air untuk mencegah terjadinya pembusukkan yang disebabkan oleh jamur dan bakteri, mencegah perubahan kimiawi yang dapat menurunkan mutu serbuk, serta mempermudah penggerusan atau pembuatan serbuk.

Kayu siwak yang sudah dikeringkan kemudian dibuat serbuk dengan tujuan untuk memperkecil partikel yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung efektif. Hasil prosentase bobot kering terhadap bobot basah kayu siwak dapat dilihat pada tabel 1. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah kayu siwak		
Bobot Simplisia	Bobot Kering	Rendemen
2,5 kg	2 kg	80 %

4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk kayu siwak

Metode penetapan susut pengeringan kayu siwak menggunakan *Moisture Balance*. Hasil penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk kayu siwak		
No	Berat serbuk (g)	Susut pengeringan (%)
1	2	7,0
2	2	6,5
3	2	7,5
Rata-rata		7%

Hasil penetapan susut pengeringan kayu siwak rata-rata sebesar 7%. Susut pengeringan memenuhi syarat dimana serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%.

5. Hasil pembuatan ekstrak etanol kayu siwak

Kayu siwak (*Salvadora persica* L) diserbukkan ditimbang 400 gram (diulangi sebanyak 5 kali). Serbuk dibasahi etanol 70% dengan perbandingan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok dengan 2,5 bagian cairan penyari sampai terbasahi semua, kemudian dimasukkan ke dalam bejana tertutup sekurang-kurangnya selama 3 jam. Massa dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam perkolator sambil sekali ditekan hati-hati, dituangi dengan pelarut secukupnya

sampai cairan mulai menetes dan di atas simplisia masih terdapat selapis cairan penyari. Perkolator ditutup dan dibiarkan menetes dengan kecepatan 1 tetes per 3 detik selama 24 jam. Kran dibuka dan dibiarkan cairan penyari menetes berulang-ulang sehingga selalu terdapat selapis cairan penyari diatas simplisia. Perkolasi dihentikan setelah cairan mulai menetes tidak berwarna. Hasil perkolasi ditampung dan diuapkan di evaporator pada suhu 40-50°C. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 12.

Tabel 3. Rendemen ekstrak etanol kayu siwak

Serbuk (kg)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%)
2	218,73	10,94%

6. Hasil uji bebas etanol ekstrak kayu siwak

Ekstrak etanol kayu siwak yang telah pekat diuji sudah bebas etanol atau dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak etanol kayu siwak positif bebas etanol karena tidak tercium bau ester yang khas dari etanol. Tujuan dilakukan uji bebas etanol pada ekstrak kayu siwak adalah untuk mencegah kesalahan pengamatan dalam tahap penelitian selanjutnya yaitu pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* sebab etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian ini.

7. Hasil fraksinasi ekstrak kayu siwak

Ekstrak kayu siwak yang diperoleh dari perkolasi kemudian ditimbang sebanyak 7,5 gram untuk dilakukan fraksinasi dilakukan sebanyak 17 kali

pengulangan. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol kayu siwak 127,5 gram dapat dilihat pada tabel 4. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 12.

Tabel 4. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol kayu siwak		
Fraksi	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
n-Heksan	18,22	14,22
Etil asetat	16,85	16,85
Air	85,085	66,73

Tabel diatas dapat diketahui bahwa hasil rendemen yang didapat setiap pelarut berbeda-beda dimana fraksi air lebih besar dibanding etil asetat dan *n*-heksan, sedangkan fraksi etil lebih besar dari pada *n*-heksan. Air merupakan pelarut yang bersifat polar sehingga dapat diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam kayu siwak lebih banyak mengandung senyawa yang bersifat polar. Hasil rendemen yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu 100% atau mendekati 100%, kemungkinan disebabkan ekstrak banyak yang menempel pada wadah.

8. Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 berdasarkan koloni dengan inokulasi suspensi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada media diferensial *Vogel Jhonson Agar* (VJA) yang telah ditetesi 3 tetes kalium telurit 1% dalam cawan peri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian menunjukkan koloni dengan warna hitam, karena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat mereduksi telurit menjadi metalik warna medium dan di sekitar koloni bewarna kuning karena fermentasi manitol, dimana dalam kondisi asam menghasilkan pigmen yang bervariasi dari putih sampai kuning tua (Jawetz *et al.*

2012). Hasil gambar identifikasi koloni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada lampiran 5.

Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara morfologi. Hasil pengamatan dengan pewarnaan Gram pada mikroskop perbesaran kuat (100x) akan tampak berwarna ungu, berbentuk bulat begerombol seperti buah anggur, karena bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) memiliki membran peptidoglikan yang lebih tebal daripada bakteri gram negatif, sehingga pada pengecatan gram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat mempertahankan warna violet dari Gram A (Kristal violet). Hasil gambar identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 5. Hasil Identifikasi bakteri uji katalase dan koagulase

Jenis uji	Hasil	Pustaka	Keterangan
Uji katalase	Terbentuk gelembung gas	Terbentuk gelembung gas	(+)
Uji koagulase	Hasil reaksi positif terjadi penjadalan	Hasil reaksi positif terjadi penjadalan	(+)

Keterangan : (+) = Positif *Staphylococcus aureus*

(-) = Negatif *Staphylococcus aureus*

9. Hasil pengujian antibakteri kayu siwak secara difusi

Hasil dari ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air kayu siwak dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi dengan konsentrasi asing-masing 50%, 25% dan 12,5% dan pembanding kontrol positif kotrimoksazol, kontrol negatif DMSO 1% untuk mengetahui fraksi paling aktif dengan melihat luas diameter daya hambat masing-masing fraksi.

Pembuatan suspensi bakteri uji dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) disesuaikan dengan kekeruhan modifikasi standard *Mc Farland* kemudian diinokulasikan ke dalam medium MHA dengan metode perataan (*Spread Plate Method*) dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Pada media tersebut dibuat sumuran dengan *boor drop*. Masa inkubasi pengujian aktivitas 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 disekitar sumuran yang menandakan bahwa kandungan kimia kayu siwak memiliki daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Hasil luas daerah hambat dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Diameter hambat uji aktivitas antibakteri secara difusi					
Sediaan uji	Konsentrasi	Diameter hambat			Rata-rata (mm)
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	50 %	18	19	17	18
	25 %	15	15	14	14,7
	12,5 %	12	11	13	12
<i>n</i> -heksan	50 %	10	10	10	10
	25 %	9	10	9	9,3
	12,5 %	9	9	9	9
Etil asetat	50 %	23	22	22	22,3
	25 %	22	21	21	21,3
	12,5 %	20	21	20	20,3
Air	50 %	18	18	18	18
	25 %	17	17	16	17,3
	12,5 %	15	15	15	15
(+) Kotrimoksazol	4,8 %	31	30	31	30,6
(-) DMSO	1%	0	0	0	0

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol kayu siwak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan

adanya daya hambat, ini dibuktikan dengan adanya daerah jernih disekitar sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri kemudian dari tabel 6 dapat dilihat bahwa diameter hambat rata-rata yang paling besar adalah fraksi etil asetat 50% untuk memastikan etil asetat betul teraktif dilanjutkan ke uji analisa data. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 6.

Analisa data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi secara statistik Analisis of Varian (ANOVA) *one way*. ANOVA *one way* digunakan untuk membandingkan sampel pada tiap konsentrasi. Data yang dianalisis dengan ANOVA) *one way* adalah konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% dari fraksi *n*-heksan, etil asetat, air, dan ekstrak etanol kayu siwak. Kontrol positif dan kontrol negatif diikut sertakan dalam analisis ANOVA *one way*. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara fraksi *n*-heksan, etil asetat, air, ekstrak etanol, kontrol positif, dan kontrol negatif guna mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji *One-Sample Kolmogorove-Sminov* diperoleh signifikasi $0,667 > 0,05$ maka H_0 diterima, data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji ANOVA. Hasil uji *oneway* ANOVA tabel diameter hambat diperoleh $F = 530,793$ dengan probabilitas $0,000 < 0,05$ yang berarti dari tiap sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Berdasarkan tabel Tukey dan Bonferroni test terdapat tanda * pada *Mean Difference*, tanda tersebut menunjukkan bahwa perbedaan diameter hambat aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Apabila tidak terdapat tanda * maka

diameter hambat aktivitas antibakteri tidak signifikan yang berarti tidak memiliki perbedaan. Hasil analisis Tukey test dan Bonferroni test dapat dilihat pada lampiran 15.

Tabel *Homogeneous Subsets* bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* terbagi dalam 8 subset semakin arah kekanan semakin besar diameter hambatnya. Subset 8 terdapat kotrimoksazol. Subset 7 terdapat etil asetat 50% dan 25%. Subset 6 terdapat etil asetat 25% dan 12,5%. Subset 5 terdapat fraksi air 50 %, ekstrak 50%, air 25. Subset 4 terdapat ekstrak 25%, fraksi air 12,5%. Subset 3 terdapat ekstrak 12,5%. Subset 2 fraksi *n*-heksan 12,5%, 25% dan 50%. Subset 1 kontrol DMSO. Diameter hambat diketahui dari subset 1-8 mempunyai beda nyata dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Berbeda dengan sampel yang termasuk dalam satu subset tidak mempunyai beda secara signifikan dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Fraksi teraktif adalah etil asetat. Tabel *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada lampiran 15.

Berdasarkan tabel 6 dan analisa data dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat memiliki daya hambat teraktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan ekstrak etanol kayu siwak, fraksi *n*-heksan dan air. Sifat etil asetat yang semi polar ini menyebabkan fraksi mengandung metabolit sekunder yang lebih kompleks dibandingkan pada fraksi polar dan non polar oleh sebab itu fraksi etil asetat lebih banyak menarik senyawa antibakteri yakni flavonid dan alkaloid, hal tersebut mengakibatkan fraksi etil asetat menjadi fraksi teraktif dengan

membentuk daya hambat paling besar serta teraktif dibandingkan fraksi *n*-heksan dan fraksi air (Sreelatha *et al.* 2014).

Senyawa flavonoid mempunyai mekanisme kerja sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat dari sel bakteri, menghambat fungsi dari membran sitoplasma, dan flavonoid juga dapat mengganggu metabolisme energi yang dibutuhkan oleh bakteri sehingga pertumbuhan bakteri terhambat (Chusnie & Lamb 2005). Alkaloid memiliki mekanisme penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (juliantina 2008).

10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat kayu siwak dan kotrimoksazol dengan metode dilusi

Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi kayu siwak dan kotrimoksazol dengan metode dilusi dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat dan kotrimoksazol dengan metode dilusi

No	Konsentrasi % Fraksi etil asetat	Replikasi			Konsentrasi % Kotrimoksazol	Replikasi		
		1	2	3		1	2	3
1	50 %	-	-	-	4,8 %	-	-	-
2	25 %	-	-	-	2,4 %	-	-	-
3	12,5 %	-	-	-	1,2 %	-	-	-
4	6,25 %	-	-	-	0,6 %	-	-	-
5	3,12 %	-	-	-	0,3 %	-	-	-
6	1,56 %	+	-	+	0,15 %	-	-	-
7	0,78 %	+	+	+	0,075 %	-	-	-
8	0,39 %	+	+	+	0,0375 %	-	-	-
9	Kontrol – (fraksi etil)	-	-	-	Kontrol - (kotrimoksazol)	-	-	-
10	Kontrol + (Suspensi Bakteri)	+	+	+	Kontrol + (Suspensi Bakteri)	+	+	+

Keterangan: (-) tidak ada pertumbuhan bakteri
(+) ada pertumbuhan bakteri

Pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat, terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilanjutkan dengan metode dilusi untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM). Konsentrasi bunuh minimum yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan menginokulasi sediaan dari tabung uji pada medium diferensial *Vogel Jhonson Agar* dalam cawan petri. Konsentrasi bunuh minimum ditentukan pada medium *Vogel Jhonson Agar* dengan konsentrasi minimum yang tidak menunjukkan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Berdasarkan tabel 7 dapat dilihat bahwa uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara dilusi dilakukan 3 kali replikasi. Konsentrasi fraksi yang digunakan yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%. Konsentrasi hambat minimum (KHM) sulit diamati karena masing-masing fraksi yang digunakan berwarna keruh sehingga perlu dilakukan inokulasi dalam medium agar diferensial untuk mengetahui konsentrasi bunuh minimum (KBM). Fraksi etil asetat konsentrasi bunuh minimumnya 3,12%.

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dibandingkan dengan antibiotik kotrimoksazol, konsentrasi bunuh minimum kotrimoksazol untuk *Staphylococcus aureus* adalah 0,0375 %. Perbandingan fraksi etil sebagai fraksi yang paling aktif dengan antibiotik pembanding kotrimoksazol sebagai antibakteri menunjukkan hasil yang masih jauh dari yang diharapkan karena antibiotik kotrimoksazol lebih aktif sebagai antibakteri

jika dibandingkan dengan fraksi teraktif yang telah diuji, maka harus dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan kandungan senyawa-senyawa kimia murni yang aktif dengan cara isolasi senyawa.

11. Hasil identifikasi kimia fraksi etil asetat secara kualitatif

Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung pada fraksi etil asetat. Hasil fraksi etil aetat yang diperoleh diambil 100 mg ditambah 20 ml air panas. Kemudian dipanaskan sampai mendidih. Filtrat yang diperoleh diidentifikasi kandungan kimianya.

Tabel 8. Hasil identifikasi fraksi etil asetat secara kualitatif

Kandungan kimia	Identifikasi	Hasil pengamatan	Pustaka	Ket
Saponin	Filtrat + air panas, kocok kuat-kuat selama 10 detik. + 1 tetes asam klorida 2N	Tidak terbentuknya buih	buih selama $\pm$ 10 menit. Penambah asam klorida 2 N, buih tidak hilang (Depkes 1980)	(-)
Flavonoid	Filtrat + 0,1 mg serbuk Mg + 2 ml alkohol-hcl (1:1) + amil alkohol, kocok.	Warna merah, Hingga pada pelarut amil alkohol	Warna merah, kuning, Hingga pada pelarut amil alkohol (Depkes 1980)	(+)
Alkaloid	1 ml filtrat + larutan HCL 2N + larutan mayer / dragendorf	1) Larutan mayer: endapan menggumpal kuning	1) mayer: endapan menggumpal putih atau kuning	(+)
		2) Dragendorf: endapan cokelat.	2) Dragendorf: endapan cokelat sampai hitam	(+)
Tanin	Filtrat + FeCl ₃ . Kocok	Tidak terbentuk warna	Warna cokelat kehijaun / biru kehitaman.	(-)

Berdasarkan tabel 9 dapat dilihat bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol kayu siwak mempunyai kandungan flavonoid dan alkaloid sedangkan tanin dan saponin negatif.

12. Hasil identifikasi fraksi teraktif secara KLT

Identifikasi terhadap kandungan kimia dengan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) hanya dilakukan pada fraksi etil karena fraksi ini mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Sebelum dilakukan identifikasi senyawa menggunakan KLT terlebih dahulu identifikasi secara kualitatif. Hasil dari identifikasi kualitatif menunjukkan bahwa etil asetat hanya memberikan hasil positif terhadap flavonoid dan alkaloid. Hasil identifikasi fraksi etil asetat secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 9. Hasil identifikasi flavonoid secara KLT

Identifikasi	Rf	Sinar tampak	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	Pereaksi semprot (Sitroborat)	Ke
Flavonoid	0,6	Tidak Tampak	Peredaman	Hijau	Kuning kecoklatan	(+)
Quarcetin	0,65	Tidak Tampak	Peredaman	Hijau	Kuning kecoklatan	(+)

Hasil identifikasi senyawa flavonoid menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform : metanol (1:1) dengan pereaksi semprot sitroborat. Bercak terlihat berwarna fluoresensi peredaman pada sinar UV 254 nm, berwarna hijau pada UV 366 nm, sinar tampak kuning ke coklatan dan Rf 0,75 Dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa flavonoid.

Tabel 10. Hasil identifikasi alkaloid secara KLT

Identifikasi	Rf	Sinar tampak	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	Pereaksi semprot (Dragendrof)	Ke
Alkaloid		Tidak Tampak	Peredaman	Hijau	Kecoklatan Kehitaman	(+)

Hasil Identifikasi senyawa alkaloid menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak toluene : etil asetat : dietilamin (7 : 2 : 1) dengan pereaksi semprot Dragendrof. Senyawa alkaloid akan terlihat bercak berwarna cokelat kehitaman sinar UV 254 nm, dan berwarna hijau sinar UV 366 nm (Harborne 1987).

Berdasarkan hasil identifikasi senyawa dengan KLT fraksi etil asetat dari ekstrak etanol kayu siwak memiliki kandungan senyawa flavonoid dan alkaloid. Mekanisme kerja senyawa fenol dalam membunuh sel bakteri yaitu dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri. Akibat terdenaturasinya protein sel bakteri, maka semua aktivitas metabolisme sel bakteri terhenti karena semua aktivitas metabolisme sel bakteri dikatalisis oleh enzim yang berupa protein. Senyawa flavonoid adalah zat antibakteri yang dapat bekerja dengan cara menghambat pertumbuhan pada bakteri dengan merusak dinding sel dan membran sitoplasma. Efek flavonoid juga dapat mencegah pembelahan bakteri sehingga bakteri tidak dapat berkembangbiak (Evans 1989). Mekanisme alkaloid dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh, terganggunya sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding selnya hanya meliputi membran sel. Peptidoglikan tersusun dari N-asetil glukosamin dan N-asetil asam muramat, yang terikat melalui ikatan 1,4-glikosida. Pada N-asetil asam muramat terdapat rantai pendek asam amino: alanin, glutamat, diaminopimelat, lisin dan alanin, yang terikat melalui ikatan peptida. Peranan ikatan peptida ini sangat penting dalam menghubungkan antara rantai

satu dengan rantai yang lain. Mekanisme kerusakan dinding bakteri terjadi karena proses perakitan dinding sel bakteri yang diawali dengan pembentukan rantai peptida yang akan membentuk jembatan silang peptida yang menggabungkan rantai glikan dari peptidoglikan pada rantai yang lain sehingga menyebabkan dinding sel terakit sempurna. Keadaan ini menyebabkan sel bakteri mudah mengalami lisis, baik berupa fisik maupun osmotik dan menyebabkan kematian sel *Staphylococcus aureus* merupakan gram positif yang memiliki lapisan peptidoglikan tebal. Sehingga lebih sensitif terhadap senyawa-senyawa yang punya potensi merusak atau menghambat sintesis dinding sel (Yuliana 2011).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa:

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air kayu siwak mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Kedua, fraksi etil asetat dari ekstrak etanol kayu siwak merupakan fraksi teraktif dalam menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Ketiga, fraksi etil asetat dari ekstrak etanol kayu siwak mempunyai Konsentrasi Bunuh Minimum terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yaitu 3,12 %.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* terhadap fraksi etil asetat dari ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* L).

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk dibuat sediaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abinnahi A, Agung P. Dhartono, Catur Aditya Ramadhany. 2014. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Kayu Siwak (*Salvadora persica*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Porphyromonas gingivalis*, Journal Kedokteran Gigi Universitas Jendral Soedirman, Jawa Tengah, Purwokerto.
- Al-Khateeb TL, OMullane DM, Whelton H, Sulaiman ML. 1991. Periodontal treatment needs among Saudi Arabian adults and their relationship to the use of the Miswak. Comm. Dent. Health 8:323-28
- Almas K, Skaug N, Ahmad I. 2005. "An in vitro Antimicrobial Comparison of Miswak Extract With Commercially Available Non-Alcohol Mouthrinses, International Journal Dental Hygien, 3:18-24.
- Basset J, RC Denney, GH Jeffrey, J Mendhom. 1994. *Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Baumgartner J.B, Bakland L.K, Sugita E. 2002. *Microbiology of Endodontics and Asepsis in Endodontic Practice*, in Ingle, J. I., and Bakland, L. K. (ed). Endodontics, 5th ed., BC Deckle, London, h. 67
- Bonang, Koeswardono ES. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Unika Atmajaya, PT Gramedia.
- Brotoisworo, 1978, *Farmakognosi*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 25- 30.
- Chusie TP dan Lamb AJ. 2005. *Antimicrobial Activity Of Flavoids International Jurnal Of Antimicrobial Agen School Of Pharmacy*, The Robert Gordon Universitas, Schoolhill, Aberdeen.
- Depkes. 1977. *Materia Medika Indonesia*. Jilid I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hlm XI.
- Depkes. 1980. *Materia Medika Indonesia*. Jilid IV. Cetakan Pertama. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Depkes. 1986. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.

- Depkes. 1994. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran Edisi Revisi*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta,
- El- Latif Hesham, Alrumman, Sulaiman, 2016 Antibacterial activity of miswak (*Salvadora persica*) extracts against isolated and genetically identified oral cavity pathogens, Biology Department Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut, Egypt.
- El-Mostehy, DR. M. Ragaii, A.A. Al-Jassem, I.A. Al-Yassin, A.R. El-Gindy, E. Shoukry, 2010, Siwak-As An Oral Health Device (Preliminary Chemical And Clinical Evaluation), Journal Pharmacology, Department of Odontology, Faculty of Dentistry, University of Kuwait, Kuwait
- Evans, W. C. 1989. Trease and Evans Pharmacognosy Basic of Therapeutics. London.
- Ganiswara, S.E. 1995. *Farmakologi dan terapi*. Edisi IV. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam*. Jilid I. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun dan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Kosasih P, Iwang S. Penerjemah; Sofia N, editor. Bandung: ITB. Terjemahan dari: Phytochemical Methods.
- Harminta, R.M. 2004. *Analisa Hayati*. Jakarta: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. dan Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition. USA. Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia..
- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*, diterjemahkan oleh Bonang G. Edisi XVI. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.
- Katno dkk. 2008. *Pengaruh Waktu Pengeringan terhadap Kadar Tanin Daun Jati Belanda (Guazuma ulmifolia lak)* . Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia Vol.1 No.1.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2007. *Medical Mikrobiology 2thEd*. The McGraw Hill Companies, USA.

- Juliantina, F.R., 2008. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Antibakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif . JKKI-*Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*.
- Martindale T. 1993. *The Extract Pharmacopeia*. Edisi 23. James EF, Rynold. Edited by London The Pharmaceutical Press.
- Mohamed Saeed Zayed Al-Ayed, Ahmed Morad Asaad, Mohamed Ansar Qureshi, Hany Goda Attia, Abduljabbar Hadi Al Marrani, 2016, Antibacterial Activity of *Salvadora persica* L (Miswak) Extracts against Multidrug Resistant Bacterial Clinical Isolates, Najran Universsity, Saudi Arabia.
- Rani, A. dan Ashok C., 2012, Isolation and Identification of Root Canal Bacterial from Symtomatic Nonvital Teeth with Periapical Pathosis, *Journal of Endodontology*.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi V. Padmawinata K, penerjemah; Bandung: ITB. Terjemahan dari: The Organic Consituents Of Higher Plants.
- Salehi P, Momeni Danaie SH., 2006, Comparison of the Antibacterial Effects of Persica Mouthwash with Chlorhexidine on *Streptococcus mutans* in *Orthodontic Patients*, DARU.
- Sreelatha R, Murali MCH, Ashok PKK, Sudesh KE. 2013. In vitro Antimicrobial Activity of Different Parts Of *Stachtarpheta Urticifolia* (Salisb) Sims. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6: 340-343.
- Stahl Egon. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Bandung. ITB.
- Sudjadi. 1986. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta : Penerbit Kanisius.
- Suriawiria SD. 1985. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Suryono B. 1995. *Bakteriologi Umum Dan Bakteriologi Klinik*. Akademi Analis Kesehatan Bhakti Jaya. Kediri.
- Tirtaaji P W. 2008. Kemampuan daya bunuh ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.

- Tjitrosoepomo G. 1998. *Taksonomi Tumbuhan 2*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Voigt R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi V. Noerono S, penerjemah; Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Yuliana Retnowati, Nurhayati Bialangi, Nona Wingti Posangi. 2011, Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Media yang Diekspos dengan Infus Daun Sambiloto. FMIPA Universiitast Negeri. Gorontalo.
- Yusro F. 2009. Efektifitas Zat Ekstraktif Kayu Pelanjau (*Pentaspadon motleyi*, Hook.f) Dalam Menghambat Pertumbuhan Cendawan *Trichophyton mentagrophytes* dan *Candida albicans* [Tesis]. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Zaenab, Mardiasuti HW, VP Anny, B Logawa. 2004. Uji Antibakteri Siwak (*Salvadora persica* Linn.) terhadap *Streptococcus mutans* (ATC 31987) dan *Bacteroides melaninogenicus*. Jurnal Makara, Kesehatan, 8(2) h. 37-40.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat keterangan melakukan identifikasi tumbuhan



**DEPARTEMEN BIOLOGI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS GADJAH MADA YOGYAKARTA**

Alamat: Sekip Utara Jl. Kaliurang Km 4, Yogyakarta 55281
Telp. : 0274.649.2568 Fax. +274-543120

SURAT KETERANGAN

No.: BF/ 19/ Ident/Det/II/2016

Kepada Yth. :
Sdri/Sdr. Achmad Raufi
NIM. 18123661A
Fakultas Farmasi USB
Di Surakarta

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi sampel kayu yang Saudara kirimkan ke Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM, adalah :

No.Pendaftaran	Jenis	Suku
19	<i>Salvadora persica</i> L.	Salvadoraceae

Demikian, semoga dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 15 Februari 2016

Ketua



Dr.rer.nat. Triana Hertiani, M.Si., Apt.
NIP. 197306091998032003

Lampiran 2. Foto tumbuhan kayu siwak (*Salvadora persica* L)



A



B

Keterangan : A = Kayu siwak

B = Serbuk kayu siwak

Lampiran 3. Gambar alat



A



B



C



D



E

Keterangan :

A = Rangkaian alat perkolasi

B = Alat Moisture balance

C = Evaporator

D = Corong pisah

E = Penggilingan Serbuk

Lampiran 4. Hasil ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, air



A



B



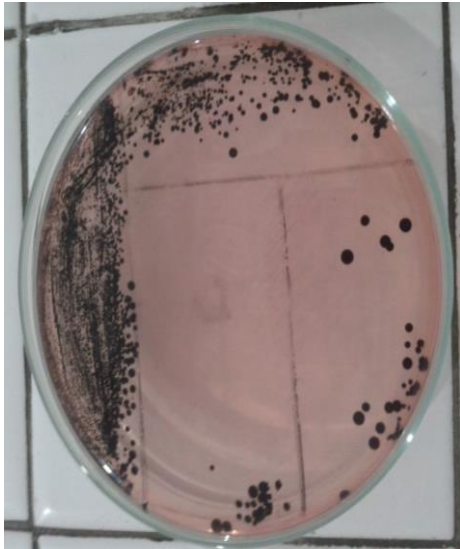
C



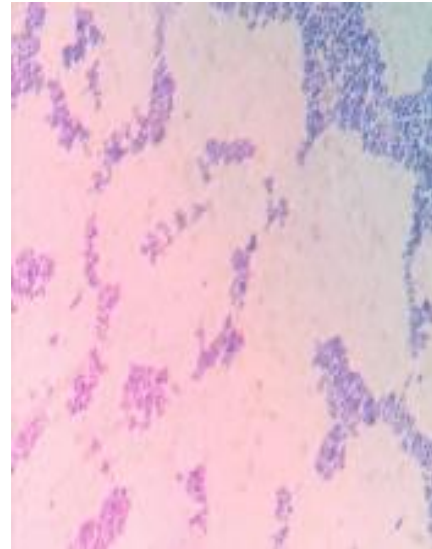
D

Keterangan : A = Ekstrak etanol
B = Ekstrak fraksi *n*-heksan
C = Ekstrak fraksi etil asetat
D = Ekstrak fraksi air

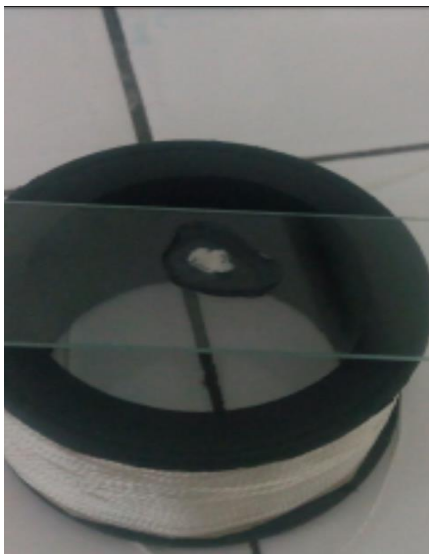
Lampiran 5. Hasil identifikasi *Stapylococcus aureus* ATCC 25923



A



B



C



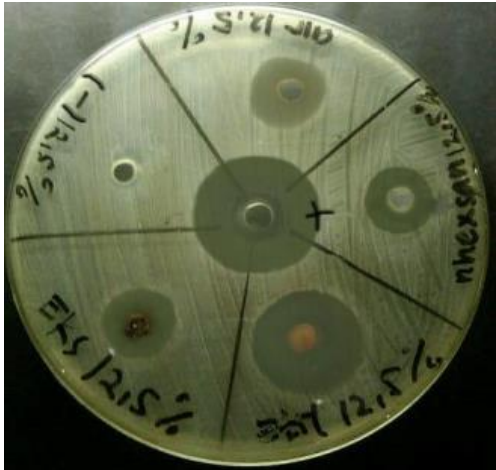
D

Keterangan : A = Identifikasi cawan gores

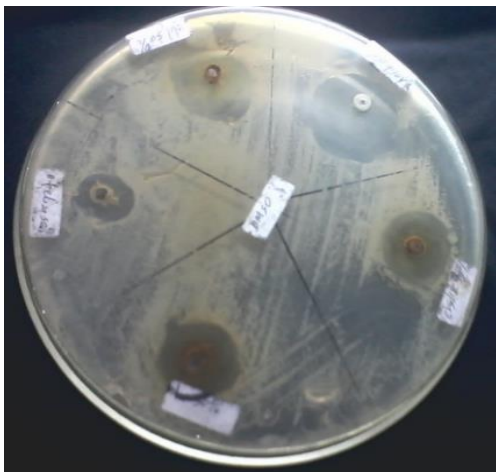
B = Pewarnaan gram

C = Hasil Uji katalase

D = Hasil koagulase

Lampiran 6. Hasil difusi

Konsentrasi 12,5%



Konsentrasi 25%



Konsentrasi 50%

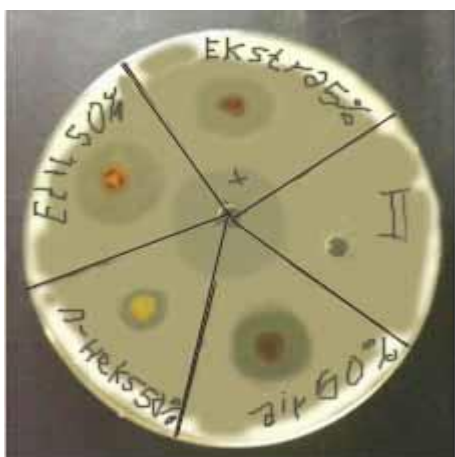
Keterangan : Hasil Difusi Replikasi 1



Konsentrasi 12,5%

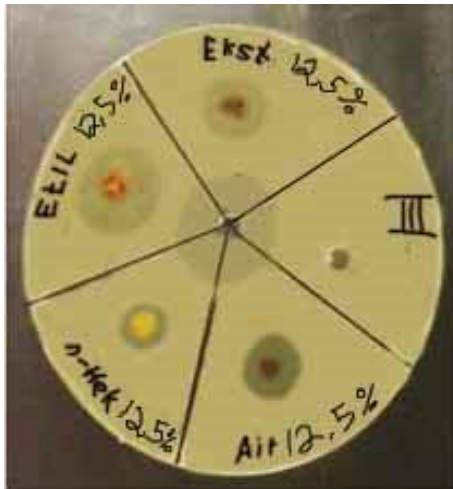


Konsentrasi 25%

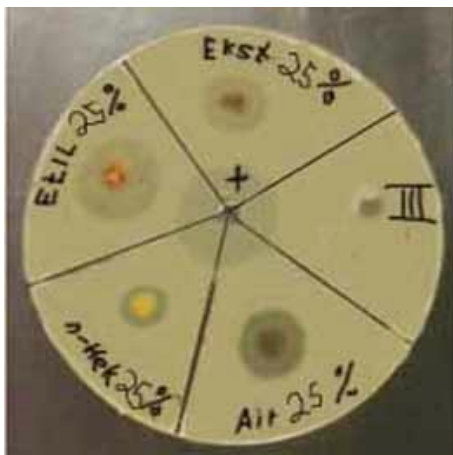


Konsentrasi 50%

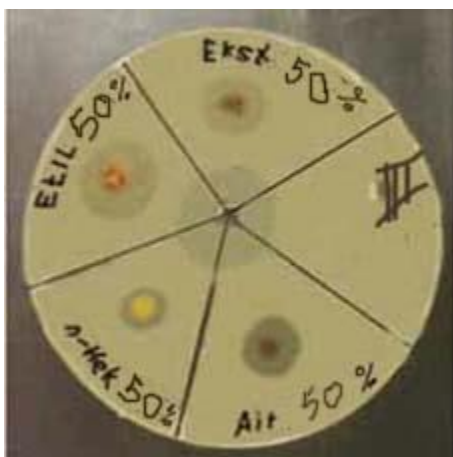
Keterangan : Hasil Difusi Replikasi 2



Konsentrasi 12,5 %

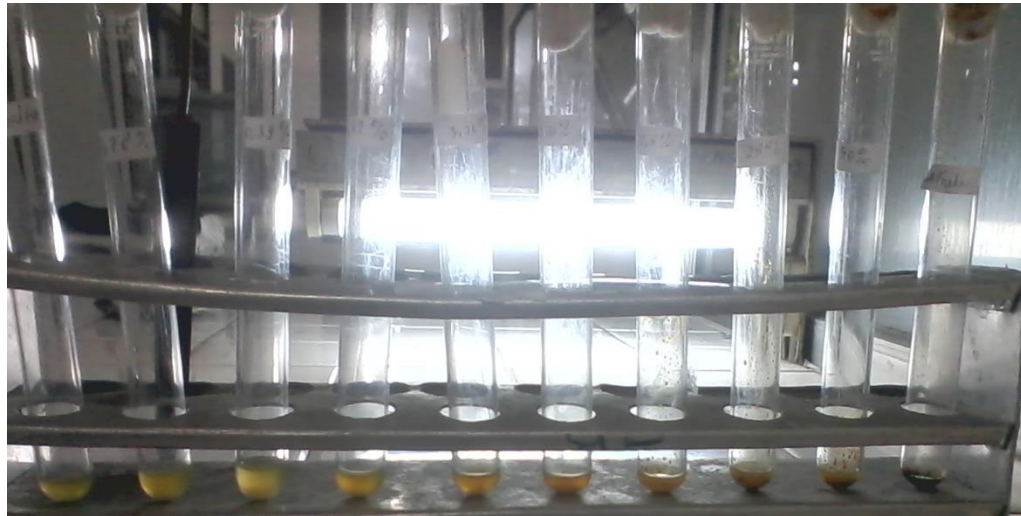
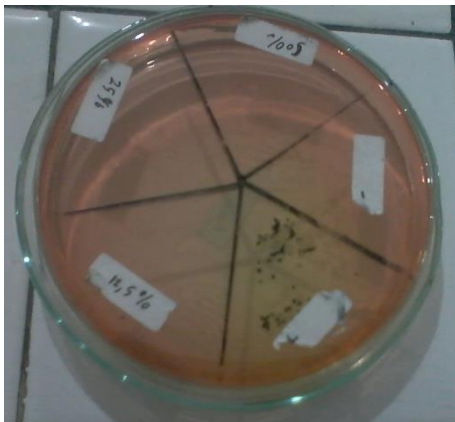
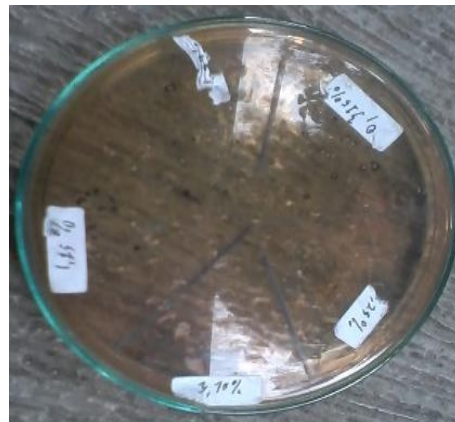


Konsentrasi 25 %

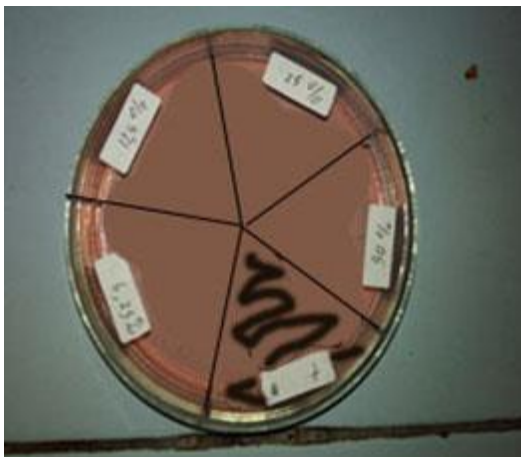


Konsentrasi 50%

Keterangan : Hasil Difusi Replikasi 2

Lampiran 7. Hasil dilusi fraksi teraktif etil asetat dan kotrimoksazol**A. Hasil dilusi fraksi teraktif etil asetat****A****B****C**

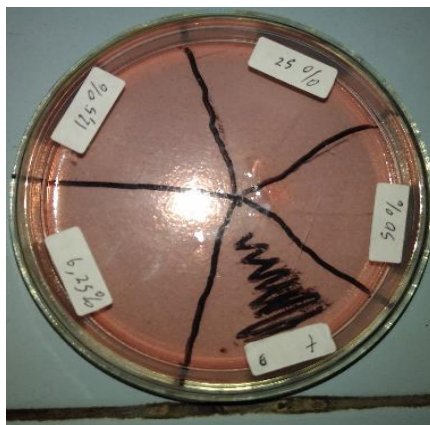
Keterangan : A = Hasil dilusi fraksi etil asetat replikasi pertama
B, C = Hasil inokulasi fraksi etil asetat replikasi pertama

**A****B****C**

Keterangan : A = Hasil dilusi fraksi etil asetat replikasi kedua
B, C = Hasil inokulasi fraksi etil asetat replikasi kedua



A



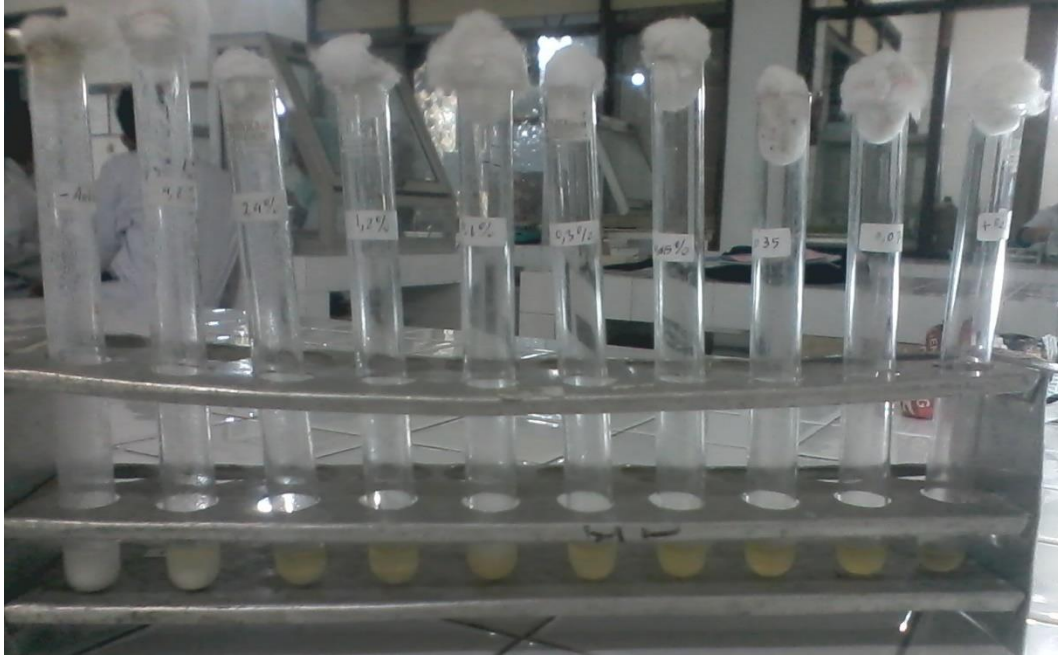
B



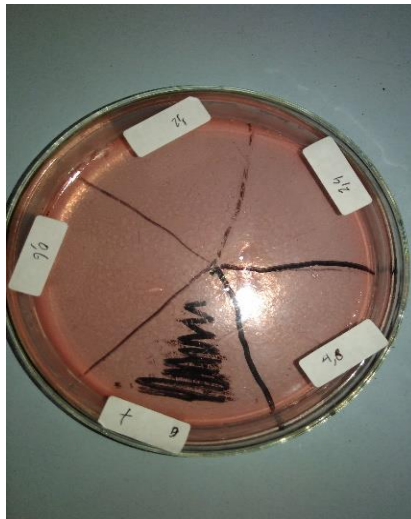
C

Keterangan : A = Hasil dilusi fraksi etil asetat replikasi ketiga.
 B, C = Hasil inokulasi fraksi etil asetat replikasi ketiga.

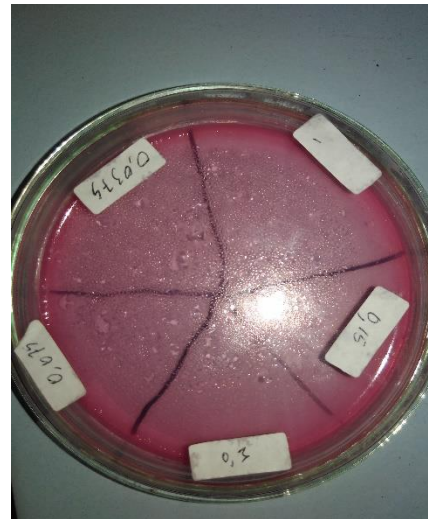
B. Hasil dilusi kotrimoksazol



A



B

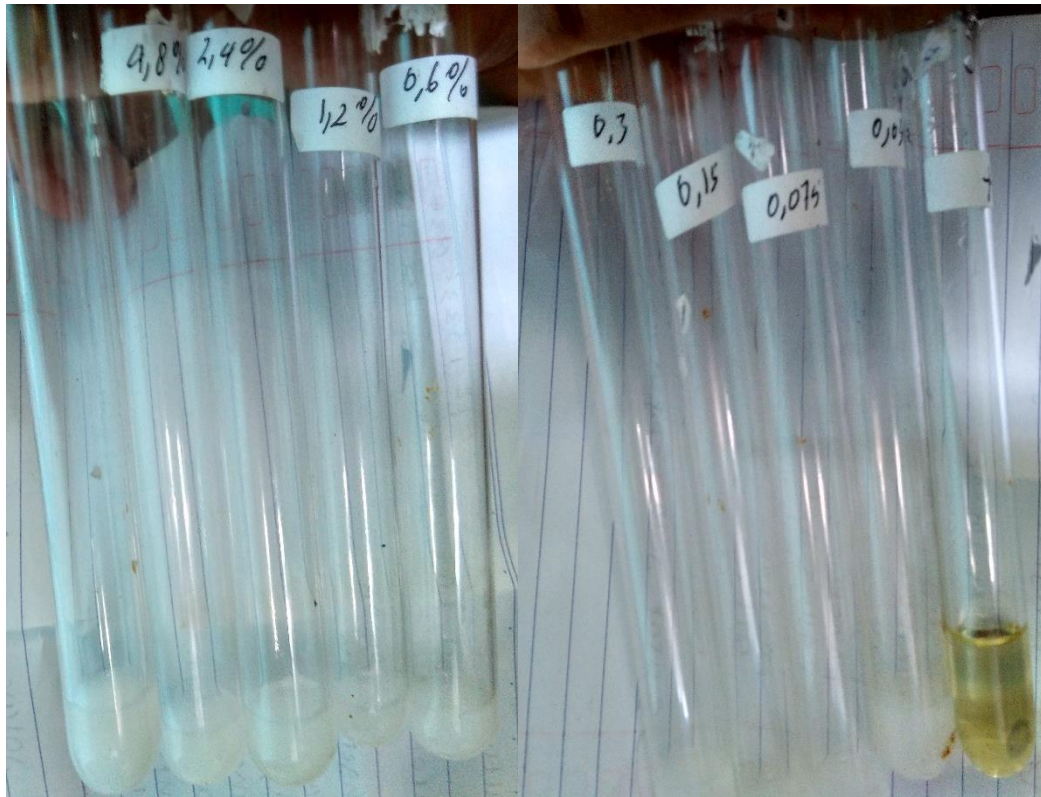


C

Keterangan : A = Hasil dilusi antibiotik kotrimoksazol replikasi Pertama.
 B, C = Hasil inokulasi antibiotik kotrimoksazol replikasi pertama.

**A****B****C**

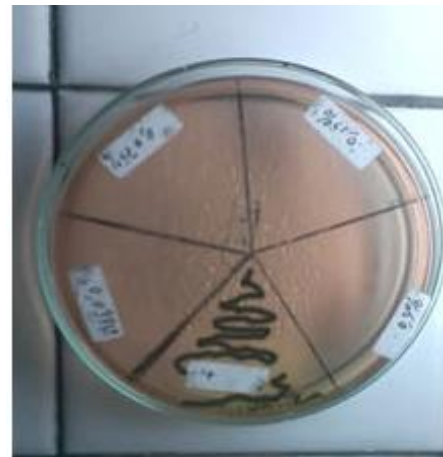
Keterangan : A = Hasil dilusi antibiotik kotrimoksazol replikasi kedua.
B, C = Hasil inokulasi antibiotik kotrimoksazol replikasi kedua.



A



B



C

Keterangan : A = Hasil dilusi antibiotik kotrimoksazol replikasi ketiga
 B, C = Hasil inokulasi antibiotik kotrimoksazol replikasi ketiga

Lampiran 8. Foto identifikasi fraksi teraktif etil asetat secara kualitatif



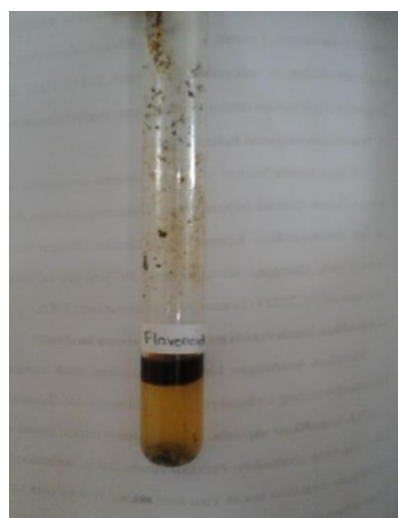
A



B



C



D

Keterangan : A = Saponin

B = Alkaloid

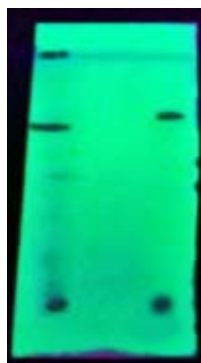
C = Tanin

D= Flavonoid

Lampiran 9. Foto identifikasi KLT fraksi teraktif etil asetat



1



2



3

Keterangan:

x Sampel (Fraksi etil)

y. Pembanding (quarcetin)

1. Semprot Sitroborat

2. UV₂₅₄3. UV₃₆₆

1



2



3

Keterangan:

x Sampel (Fraksi etil)

1. semprot Dragendrof

2. UV₂₅₄3. UV₃₆₆

B

Keterangan : A = Hasil KLT Flavonoid

B = Hasil KLT Alkaloid

Lampiran 10. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah kayu siwak

Bobot Simplisia	Bobot Kering	Rendemen
2,5 kg	2 kg	80%

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen serbuk} &= \frac{\text{bobot kering (g)}}{\text{bobot basah (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{2.000 (g)}{2.500 (g)} \times 100 \% \\
 &= 80 \%
 \end{aligned}$$

Lampiran 11. Hasil penyusutan pengeringan kayu siwak

No	Berat serbuk (g)	Susut pengeringan (%)
1	2	7,0
2	2	6,5
3	2	7,5
Rata-rata		7%

Rata-rata penyusutan pengeringan: $\frac{7,0+6,5+7,5}{3} = 7 \%$

Lampiran 12. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air kayu siwak

A. Rendemen Ekstrak etanol

No	Serbuk (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%)
1	400	43,746	10,94%
2	400	43,726	10,93%
3	400	43,700	10,92%
4	400	43,782	10,94%
5	400	43,776	10,94%
Total	2,000	218,73	10,94%

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

$$1. \text{ Rendemen ekstrak etanol} = \frac{43,746(g)}{400(g)} \times 100 \% = 10,94\%$$

$$2. \text{ Rendemen ekstrak etanol} = \frac{43,726(g)}{400(g)} \times 100 \% = 10,93\%$$

$$3. \text{ Rendemen ekstrak etanol} = \frac{43,700(g)}{400(g)} \times 100 \% = 10,92\%$$

$$4. \text{ Rendemen ekstrak etanol} = \frac{43,782(g)}{400(g)} \times 100 \% = 10,94\%$$

$$5. \text{ Rendemen ekstrak etanol} = \frac{43,776(g)}{400(g)} \times 100 \% = 10,94\%$$

$$\text{Total Rendemen ekstrak etanol} = \frac{218,73(g)}{2.000(g)} \times 100 \% = 10,94\%$$

B. Rendemen fraksi kayu siwak

Fraksi	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
n-Heksan	18,22	14,22
Etil asetat	16,85	16,85
Air	85,085	66,73

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

$$\text{Rendemen fraksi } n\text{-heksan} = \frac{18,22(g)}{127,5(g)} \times 100 \% = 14,29\%$$

$$\text{Rendemen fraksi etil asetat} = \frac{21,48(g)}{127,5(g)} \times 100 \% = 16,25\%$$

$$\text{Rendemen fraksi air} = \frac{85,085(g)}{127,5(g)} \times 100 \% = 66,75\%$$

Lampiran 13. Pembuatan larutan stok difusi dan dilusi

A. Larutan stok difusi

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

$$\text{Konsentrasi } 25\% \text{ } ^b/v : V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1.50 = 1 . 25$$

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

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

$$\text{Konsentrasi } 12,5\% \text{ } ^b/v : V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1.50 = 1.12,5$$

$$V_1 = 0,25 \text{ ml}$$

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

B. Larutan dilusi

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

$$\text{Konsentrasi } 50\% = 0,5 \text{ gram} / \text{ml}$$

$$\text{Konsentrasi } 25\% = V_1 . C_1 = V_2 . C_2$$

$$0,5 . 50\% = 1 . C_2$$

$$C_2 = 25 \%$$

$$\text{Konsentrasi } 12,5\% = V_1 . C_1 = V_2 . C_2$$

$$0,5 . 25\% = 1 . C_2$$

$$C_2 = 12,5 \%$$

$$\text{Konsentrasi } 6,25\% = V_1 . C_1 = V_2 . C_2$$

$$0,5 . 12,5\% = 1 . C_2$$

$$C_2 = 6,25 \%$$

$$\text{Konsentrasi } 3,125\% = V_1 . C_1 = V_2 . C_2$$

$$0,5 \cdot 6,25\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 3,125 \%$$

$$\text{Konsentrasi } 1,25\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 3,125\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 1,25 \%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,78\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 1,25\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,78 \%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,39\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,78\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,39 \%$$

Kontrol negatif (-) berisi 1 ml Fraksi

Kontrol positif (+) berisi 1 ml suspensi bakteri

Lampiran 14. Lampiran pengujian dosis antibiotik Ktrimoksazol

Kotrimoksazol terdiri dari 200 mg Sulfametoksazol dan 40 mg trimetropim/ 5ml

Memakai pipet droper 50 μ l.

Dosis amoxilin = 240 mg/5ml = 48 mg/ml

$$= 4,8 \text{ g/100ml} = 4,8\% \text{ } ^b/v$$

Konsentrasi 1 = 4,8 %

$$\text{Konsentrasi 2} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 4,8\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 2,4 \%$$

$$\text{Konsentrasi 3} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 2,4\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 1,2 \%$$

$$\text{Konsentrasi 4} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 1,2\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,6 \%$$

$$\text{Konsentrasi 5} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,6\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,3 \%$$

$$\text{Konsentrasi 6} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,3\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,15 \%$$

$$\text{Konsentrasi 7} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,15\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,075 \%$$

$$\text{Konsentrasi 8} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,075\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,0375 \%$$

Lampiran 15. Hasil data difusi secara ANOVA *one way*

Descriptive Statistics					
	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Diameter hambatan	42	15,52	7,232	0	31

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Diameter hambatan
N		42
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	15,52
	Std. Deviation	7,232
Most Extreme Differences	Absolute	,112
	Positive	,090
	Negative	-,112
Kolmogorov-Smirnov Z		,726
Asymp. Sig. (2-tailed)		,667

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances				
Diameter hambatan				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
3,003	13	28	,007	

ANOVA					
Diameter hambatan					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2135,810	13	164,293	530,793	,000
Within Groups	8,667	28	,310		
Total	2144,476	41			

Post Hoc Test

Multiple Comparisons

Dependent Variable:Diameter hambat

	(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	ekstrak 50%	ekstrak 25 %	3,333*	,454	,000	1,67	5,00
		ekstrak 12,5%	6,000*	,454	,000	4,34	7,66
		n-heksan 50%	8,000*	,454	,000	6,34	9,66
		n-heksan 25%	8,667*	,454	,000	7,00	10,33
		n-heksan 12,5%	9,000*	,454	,000	7,34	10,66
		etil asetat 50%	-4,333*	,454	,000	-6,00	-2,67
		etil asetat 25 %	-3,333*	,454	,000	-5,00	-1,67
		etil asetat 12,5 %	-2,333*	,454	,001	-4,00	-,67
		air 50 %	,000	,454	1,000	-1,66	1,66
		air 25 %	1,333	,454	,221	-,33	3,00
		air 12,5 %	3,000*	,454	,000	1,34	4,66
		kontrol	-12,667*	,454	,000	-14,33	-11,00
		kotrimoksazol (+)					
		kontrol DMSO (-)	18,000*	,454	,000	16,34	19,66
	ekstrak 25 %	ekstrak 50%	-3,333*	,454	,000	-5,00	-1,67
		ekstrak 12,5%	2,667*	,454	,000	1,00	4,33
		n-heksan 50%	4,667*	,454	,000	3,00	6,33
		n-heksan 25%	5,333*	,454	,000	3,67	7,00
		n-heksan 12,5%	5,667*	,454	,000	4,00	7,33
		etil asetat 50%	-7,667*	,454	,000	-9,33	-6,00
		etil asetat 25 %	-6,667*	,454	,000	-8,33	-5,00
		etil asetat 12,5 %	-5,667*	,454	,000	-7,33	-4,00
		air 50 %	-3,333*	,454	,000	-5,00	-1,67
		air 25 %	-2,000*	,454	,008	-3,66	-,34
		air 12,5 %	-,333	,454	1,000	-2,00	1,33
		kontrol	-16,000*	,454	,000	-17,66	-14,34
		kotrimoksazol (+)					

kontrol DMSO (-)		14,667*	,454	,000	13,00	16,33
ekstrak 12,5%	ekstrak 50%	-6,000*	,454	,000	-7,66	-4,34
	ekstrak 25 %	-2,667*	,454	,000	-4,33	-1,00
	n-heksan 50%	2,000*	,454	,008	,34	3,66
	n-heksan 25%	2,667*	,454	,000	1,00	4,33
	n-heksan 12,5%	3,000*	,454	,000	1,34	4,66
	etil asetat 50%	-10,333*	,454	,000	-12,00	-8,67
	etil asetat 25 %	-9,333*	,454	,000	-11,00	-7,67
	etil asetat 12,5 %	-8,333*	,454	,000	-10,00	-6,67
	air 50 %	-6,000*	,454	,000	-7,66	-4,34
	air 25 %	-4,667*	,454	,000	-6,33	-3,00
	air 12,5 %	-3,000*	,454	,000	-4,66	-1,34
	kontrol	-18,667*	,454	,000	-20,33	-17,00
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	12,000*	,454	,000	10,34	13,66
n-heksan 50%	ekstrak 50%	-8,000*	,454	,000	-9,66	-6,34
	ekstrak 25 %	-4,667*	,454	,000	-6,33	-3,00
	ekstrak 12,5%	-2,000*	,454	,008	-3,66	-,34
	n-heksan 25%	,667	,454	,963	-1,00	2,33
	n-heksan 12,5%	1,000	,454	,631	-,66	2,66
	etil asetat 50%	-12,333*	,454	,000	-14,00	-10,67
	etil asetat 25 %	-11,333*	,454	,000	-13,00	-9,67
	etil asetat 12,5 %	-10,333*	,454	,000	-12,00	-8,67
	air 50 %	-8,000*	,454	,000	-9,66	-6,34
	air 25 %	-6,667*	,454	,000	-8,33	-5,00
	air 12,5 %	-5,000*	,454	,000	-6,66	-3,34
	kontrol	-20,667*	,454	,000	-22,33	-19,00
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	10,000*	,454	,000	8,34	11,66
n-heksan 25%	ekstrak 50%	-8,667*	,454	,000	-10,33	-7,00
	ekstrak 25 %	-5,333*	,454	,000	-7,00	-3,67
	ekstrak 12,5%	-2,667*	,454	,000	-4,33	-1,00
	n-heksan 50%	-,667	,454	,963	-2,33	1,00

	n-heksan 12,5%	,333	,454	1,000	-1,33	2,00
	etil asetat 50%	-13,000*	,454	,000	-14,66	-11,34
	etil asetat 25 %	-12,000*	,454	,000	-13,66	-10,34
	etil asetat 12,5 %	-11,000*	,454	,000	-12,66	-9,34
	air 50 %	-8,667*	,454	,000	-10,33	-7,00
	air 25 %	-7,333*	,454	,000	-9,00	-5,67
	air 12,5 %	-5,667*	,454	,000	-7,33	-4,00
	kontrol	-21,333*	,454	,000	-23,00	-19,67
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	9,333*	,454	,000	7,67	11,00
n-heksan 12,5%	ekstrak 50%	-9,000*	,454	,000	-10,66	-7,34
	ekstrak 25 %	-5,667*	,454	,000	-7,33	-4,00
	ekstrak 12,5%	-3,000*	,454	,000	-4,66	-1,34
	n-heksan 50%	-1,000	,454	,631	-2,66	,66
	n-heksan 25%	-,333	,454	1,000	-2,00	1,33
	etil asetat 50%	-13,333*	,454	,000	-15,00	-11,67
	etil asetat 25 %	-12,333*	,454	,000	-14,00	-10,67
	etil asetat 12,5 %	-11,333*	,454	,000	-13,00	-9,67
	air 50 %	-9,000*	,454	,000	-10,66	-7,34
	air 25 %	-7,667*	,454	,000	-9,33	-6,00
	air 12,5 %	-6,000*	,454	,000	-7,66	-4,34
	kontrol	-21,667*	,454	,000	-23,33	-20,00
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	9,000*	,454	,000	7,34	10,66
etil asetat 50%	ekstrak 50%	4,333*	,454	,000	2,67	6,00
	ekstrak 25 %	7,667*	,454	,000	6,00	9,33
	ekstrak 12,5%	10,333*	,454	,000	8,67	12,00
	n-heksan 50%	12,333*	,454	,000	10,67	14,00
	n-heksan 25%	13,000*	,454	,000	11,34	14,66
	n-heksan 12,5%	13,333*	,454	,000	11,67	15,00
	etil asetat 25 %	1,000	,454	,631	-,66	2,66
	etil asetat 12,5 %	2,000*	,454	,008	,34	3,66
	air 50 %	4,333*	,454	,000	2,67	6,00

	air 25 %	5,667*	,454	,000	4,00	7,33
	air 12,5 %	7,333*	,454	,000	5,67	9,00
	kontrol	-8,333*	,454	,000	-10,00	-6,67
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	22,333*	,454	,000	20,67	24,00
etil asetat 25 %	ekstrak 50%	3,333*	,454	,000	1,67	5,00
	ekstrak 25 %	6,667*	,454	,000	5,00	8,33
	ekstrak 12,5%	9,333*	,454	,000	7,67	11,00
	n-heksan 50%	11,333*	,454	,000	9,67	13,00
	n-heksan 25%	12,000*	,454	,000	10,34	13,66
	n-heksan 12,5%	12,333*	,454	,000	10,67	14,00
	etil asetat 50%	-1,000	,454	,631	-2,66	,66
	etil asetat 12,5 %	1,000	,454	,631	-,66	2,66
	air 50 %	3,333*	,454	,000	1,67	5,00
	air 25 %	4,667*	,454	,000	3,00	6,33
	air 12,5 %	6,333*	,454	,000	4,67	8,00
	kontrol	-9,333*	,454	,000	-11,00	-7,67
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	21,333*	,454	,000	19,67	23,00
etil asetat 12,5 %	ekstrak 50%	2,333*	,454	,001	,67	4,00
	ekstrak 25 %	5,667*	,454	,000	4,00	7,33
	ekstrak 12,5%	8,333*	,454	,000	6,67	10,00
	n-heksan 50%	10,333*	,454	,000	8,67	12,00
	n-heksan 25%	11,000*	,454	,000	9,34	12,66
	n-heksan 12,5%	11,333*	,454	,000	9,67	13,00
	etil asetat 50%	-2,000*	,454	,008	-3,66	-,34
	etil asetat 25 %	-1,000	,454	,631	-2,66	,66
	air 50 %	2,333*	,454	,001	,67	4,00
	air 25 %	3,667*	,454	,000	2,00	5,33
	air 12,5 %	5,333*	,454	,000	3,67	7,00
	Kontrol	-10,333*	,454	,000	-12,00	-8,67
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	20,333*	,454	,000	18,67	22,00

air 50 %	ekstrak 50%	,000	,454	1,000	-1,66	1,66
	ekstrak 25 %	3,333*	,454	,000	1,67	5,00
	ekstrak 12,5%	6,000*	,454	,000	4,34	7,66
	n-heksan 50%	8,000*	,454	,000	6,34	9,66
	n-heksan 25%	8,667*	,454	,000	7,00	10,33
	n-heksan 12,5%	9,000*	,454	,000	7,34	10,66
	etil asetat 50%	-4,333*	,454	,000	-6,00	-2,67
	etil asetat 25 %	-3,333*	,454	,000	-5,00	-1,67
	etil asetat 12,5 %	-2,333*	,454	,001	-4,00	-,67
	air 25 %	1,333	,454	,221	-,33	3,00
	air 12,5 %	3,000*	,454	,000	1,34	4,66
	kontrol	-12,667*	,454	,000	-14,33	-11,00
	kotrimoksazol (+)					
	Kontrol DMSO (-)	18,000*	,454	,000	16,34	19,66
air 25 %	ekstrak 50%	-1,333	,454	,221	-3,00	,33
	ekstrak 25 %	2,000*	,454	,008	,34	3,66
	ekstrak 12,5%	4,667*	,454	,000	3,00	6,33
	n-heksan 50%	6,667*	,454	,000	5,00	8,33
	n-heksan 25%	7,333*	,454	,000	5,67	9,00
	n-heksan 12,5%	7,667*	,454	,000	6,00	9,33
	etil asetat 50%	-5,667*	,454	,000	-7,33	-4,00
	etil asetat 25 %	-4,667*	,454	,000	-6,33	-3,00
	etil asetat 12,5 %	-3,667*	,454	,000	-5,33	-2,00
	air 50 %	-1,333	,454	,221	-3,00	,33
	air 12,5 %	1,667*	,454	,049	,00	3,33
	kontrol	-14,000*	,454	,000	-15,66	-12,34
	kotrimoksazol (+)					
	Kontrol DMSO (-)	16,667*	,454	,000	15,00	18,33
air 12,5 %	ekstrak 50%	-3,000*	,454	,000	-4,66	-1,34
	ekstrak 25 %	,333	,454	1,000	-1,33	2,00
	ekstrak 12,5%	3,000*	,454	,000	1,34	4,66
	n-heksan 50%	5,000*	,454	,000	3,34	6,66
	n-heksan 25%	5,667*	,454	,000	4,00	7,33

	n-heksan 12,5%	6,000*	,454	,000	4,34	7,66
	etil asetat 50%	-7,333*	,454	,000	-9,00	-5,67
	etil asetat 25 %	-6,333*	,454	,000	-8,00	-4,67
	etil asetat 12,5 %	-5,333*	,454	,000	-7,00	-3,67
	air 50 %	-3,000*	,454	,000	-4,66	-1,34
	air 25 %	-1,667*	,454	,049	-3,33	,00
	kontrol	-15,667*	,454	,000	-17,33	-14,00
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	15,000*	,454	,000	13,34	16,66
Kontrol	ekstrak 50%	12,667*	,454	,000	11,00	14,33
Kotrimoksazol	ekstrak 25 %	16,000*	,454	,000	14,34	17,66
(+)	ekstrak 12,5%	18,667*	,454	,000	17,00	20,33
	n-heksan 50%	20,667*	,454	,000	19,00	22,33
	n-heksan 25%	21,333*	,454	,000	19,67	23,00
	n-heksan 12,5%	21,667*	,454	,000	20,00	23,33
	etil asetat 50%	8,333*	,454	,000	6,67	10,00
	etil asetat 25 %	9,333*	,454	,000	7,67	11,00
	etil asetat 12,5 %	10,333*	,454	,000	8,67	12,00
	air 50 %	12,667*	,454	,000	11,00	14,33
	air 25 %	14,000*	,454	,000	12,34	15,66
	air 12,5 %	15,667*	,454	,000	14,00	17,33
	kontrol DMSO (-)	30,667*	,454	,000	29,00	32,33
kontrol DMSO (-)	ekstrak 50%	-18,000*	,454	,000	-19,66	-16,34
)	ekstrak 25 %	-14,667*	,454	,000	-16,33	-13,00
	ekstrak 12,5%	-12,000*	,454	,000	-13,66	-10,34
	n-heksan 50%	-10,000*	,454	,000	-11,66	-8,34
	n-heksan 25%	-9,333*	,454	,000	-11,00	-7,67
	n-heksan 12,5%	-9,000*	,454	,000	-10,66	-7,34
	etil asetat 50%	-22,333*	,454	,000	-24,00	-20,67
	etil asetat 25 %	-21,333*	,454	,000	-23,00	-19,67
	etil asetat 12,5 %	-20,333*	,454	,000	-22,00	-18,67
	air 50 %	-18,000*	,454	,000	-19,66	-16,34
	air 25 %	-16,667*	,454	,000	-18,33	-15,00

	air 12,5 %	-15,000*	,454	,000	-16,66	-13,34	
	kontrol	-30,667*	,454	,000	-32,33	-29,00	
	kotrimokazol (+)						
Bonferro ni	ekstrak 50%	ekstrak 25 %	3,333*	,454	,000	1,56	5,10
		ekstrak 12,5%	6,000*	,454	,000	4,23	7,77
		n-heksan 50%	8,000*	,454	,000	6,23	9,77
		n-heksan 25%	8,667*	,454	,000	6,90	10,44
		n-heksan 12,5%	9,000*	,454	,000	7,23	10,77
		etil asetat 50%	-4,333*	,454	,000	-6,10	-2,56
		etil asetat 25 %	-3,333*	,454	,000	-5,10	-1,56
		etil asetat 12,5 %	-2,333*	,454	,002	-4,10	-,56
		air 50 %	,000	,454	1,000	-1,77	1,77
		air 25 %	1,333	,454	,600	-,44	3,10
		air 12,5 %	3,000*	,454	,000	1,23	4,77
		kontrol	-12,667*	,454	,000	-14,44	-10,90
		Kotrimoksazol (+)					
		Kontrol DMSO (-)	18,000*	,454	,000	16,23	19,77
		ekstrak 25 %	ekstrak 50%	-3,333*	,454	,000	-5,10
		ekstrak 12,5%	2,667*	,454	,000	,90	4,44
		n-heksan 50%	4,667*	,454	,000	2,90	6,44
		n-heksan 25%	5,333*	,454	,000	3,56	7,10
		n-heksan 12,5%	5,667*	,454	,000	3,90	7,44
		etil asetat 50%	-7,667*	,454	,000	-9,44	-5,90
		etil asetat 25 %	-6,667*	,454	,000	-8,44	-4,90
		etil asetat 12,5 %	-5,667*	,454	,000	-7,44	-3,90
		air 50 %	-3,333*	,454	,000	-5,10	-1,56
		air 25 %	-2,000*	,454	,013	-3,77	-,23
		air 12,5 %	-,333	,454	1,000	-2,10	1,44
		kontrol	-16,000*	,454	,000	-17,77	-14,23
		Kotrimoksazol (+)					
		Kontrol DMSO (-)	14,667*	,454	,000	12,90	16,44
		ekstrak 12,5%	ekstrak 50%	-6,000*	,454	,000	-7,77
		ekstrak 25 %	-2,667*	,454	,000	-4,44	-,90

	n-heksan 50%	2,000*	,454	,013	,23	3,77
	n-heksan 25%	2,667*	,454	,000	,90	4,44
	n-heksan 12,5%	3,000*	,454	,000	1,23	4,77
	etil asetat 50%	-10,333*	,454	,000	-12,10	-8,56
	etil asetat 25 %	-9,333*	,454	,000	-11,10	-7,56
	etil asetat 12,5 %	-8,333*	,454	,000	-10,10	-6,56
	air 50 %	-6,000*	,454	,000	-7,77	-4,23
	air 25 %	-4,667*	,454	,000	-6,44	-2,90
	air 12,5 %	-3,000*	,454	,000	-4,77	-1,23
	kontrol	-18,667*	,454	,000	-20,44	-16,90
	Kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	12,000*	,454	,000	10,23	13,77
n-heksan 50%	ekstrak 50%	-8,000*	,454	,000	-9,77	-6,23
	ekstrak 25 %	-4,667*	,454	,000	-6,44	-2,90
	ekstrak 12,5%	-2,000*	,454	,013	-3,77	-,23
	n-heksan 25%	,667	,454	1,000	-1,10	2,44
	n-heksan 12,5%	1,000	,454	1,000	-,77	2,77
	etil asetat 50%	-12,333*	,454	,000	-14,10	-10,56
	etil asetat 25 %	-11,333*	,454	,000	-13,10	-9,56
	etil asetat 12,5 %	-10,333*	,454	,000	-12,10	-8,56
	air 50 %	-8,000*	,454	,000	-9,77	-6,23
	air 25 %	-6,667*	,454	,000	-8,44	-4,90
	air 12,5 %	-5,000*	,454	,000	-6,77	-3,23
	kontrol	-20,667*	,454	,000	-22,44	-18,90
	Kotrimoksazol (+)					
	Kontrol DMSO (-)	10,000*	,454	,000	8,23	11,77
n-heksan 25%	ekstrak 50%	-8,667*	,454	,000	-10,44	-6,90
	ekstrak 25 %	-5,333*	,454	,000	-7,10	-3,56
	ekstrak 12,5%	-2,667*	,454	,000	-4,44	-,90
	n-heksan 50%	-,667	,454	1,000	-2,44	1,10
	n-heksan 12,5%	,333	,454	1,000	-1,44	2,10
	etil asetat 50%	-13,000*	,454	,000	-14,77	-11,23
	etil asetat 25 %	-12,000*	,454	,000	-13,77	-10,23

	etil asetat 12,5 %	-11,000*	,454	,000	-12,77	-9,23
	air 50 %	-8,667*	,454	,000	-10,44	-6,90
	air 25 %	-7,333*	,454	,000	-9,10	-5,56
	air 12,5 %	-5,667*	,454	,000	-7,44	-3,90
	kontrol	-21,333*	,454	,000	-23,10	-19,56
	Kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	9,333*	,454	,000	7,56	11,10
n-heksan 12,5%	ekstrak 50%	-9,000*	,454	,000	-10,77	-7,23
	ekstrak 25 %	-5,667*	,454	,000	-7,44	-3,90
	ekstrak 12,5%	-3,000*	,454	,000	-4,77	-1,23
	n-heksan 50%	-1,000	,454	1,000	-2,77	,77
	n-heksan 25%	-,333	,454	1,000	-2,10	1,44
	etil asetat 50%	-13,333*	,454	,000	-15,10	-11,56
	etil asetat 25 %	-12,333*	,454	,000	-14,10	-10,56
	etil asetat 12,5 %	-11,333*	,454	,000	-13,10	-9,56
	air 50 %	-9,000*	,454	,000	-10,77	-7,23
	air 25 %	-7,667*	,454	,000	-9,44	-5,90
	air 12,5 %	-6,000*	,454	,000	-7,77	-4,23
	kontrol	-21,667*	,454	,000	-23,44	-19,90
	Kotrimoksazol (+)					
	Kontrol DMSO (-)	9,000*	,454	,000	7,23	10,77
etil asetat 50%	ekstrak 50%	4,333*	,454	,000	2,56	6,10
	ekstrak 25 %	7,667*	,454	,000	5,90	9,44
	ekstrak 12,5%	10,333*	,454	,000	8,56	12,10
	n-heksan 50%	12,333*	,454	,000	10,56	14,10
	n-heksan 25%	13,000*	,454	,000	11,23	14,77
	n-heksan 12,5%	13,333*	,454	,000	11,56	15,10
	etil asetat 25 %	1,000	,454	1,000	-,77	2,77
	etil asetat 12,5 %	2,000*	,454	,013	,23	3,77
	air 50 %	4,333*	,454	,000	2,56	6,10
	air 25 %	5,667*	,454	,000	3,90	7,44
	air 12,5 %	7,333*	,454	,000	5,56	9,10

Kontrol		-8,333*	,454	,000	-10,10	-6,56
kotrimoksazol (+)						
kontrol DMSO (-)		22,333*	,454	,000	20,56	24,10
etil asetat 25 %	ekstrak 50%	3,333*	,454	,000	1,56	5,10
	ekstrak 25 %	6,667*	,454	,000	4,90	8,44
	ekstrak 12,5%	9,333*	,454	,000	7,56	11,10
	n-heksan 50%	11,333*	,454	,000	9,56	13,10
	n-heksan 25%	12,000*	,454	,000	10,23	13,77
	n-heksan 12,5%	12,333*	,454	,000	10,56	14,10
	etil asetat 50%	-1,000	,454	1,000	-2,77	,77
	etil asetat 12,5 %	1,000	,454	1,000	-,77	2,77
	air 50 %	3,333*	,454	,000	1,56	5,10
	air 25 %	4,667*	,454	,000	2,90	6,44
	air 12,5 %	6,333*	,454	,000	4,56	8,10
	kontrol	-9,333*	,454	,000	-11,10	-7,56
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	21,333*	,454	,000	19,56	23,10
etil asetat 12,5 %	ekstrak 50%	2,333*	,454	,002	,56	4,10
	ekstrak 25 %	5,667*	,454	,000	3,90	7,44
	ekstrak 12,5%	8,333*	,454	,000	6,56	10,10
	n-heksan 50%	10,333*	,454	,000	8,56	12,10
	n-heksan 25%	11,000*	,454	,000	9,23	12,77
	n-heksan 12,5%	11,333*	,454	,000	9,56	13,10
	etil asetat 50%	-2,000*	,454	,013	-3,77	-,23
	etil asetat 25 %	-1,000	,454	1,000	-2,77	,77
	air 50 %	2,333*	,454	,002	,56	4,10
	air 25 %	3,667*	,454	,000	1,90	5,44
	air 12,5 %	5,333*	,454	,000	3,56	7,10
	kontrol	-10,333*	,454	,000	-12,10	-8,56
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	20,333*	,454	,000	18,56	22,10
air 50 %	ekstrak 50%	,000	,454	1,000	-1,77	1,77
	ekstrak 25 %	3,333*	,454	,000	1,56	5,10

	ekstrak 12,5%	6,000*	,454	,000	4,23	7,77
	n-heksan 50%	8,000*	,454	,000	6,23	9,77
	n-heksan 25%	8,667*	,454	,000	6,90	10,44
	n-heksan 12,5%	9,000*	,454	,000	7,23	10,77
	etil asetat 50%	-4,333*	,454	,000	-6,10	-2,56
	etil asetat 25 %	-3,333*	,454	,000	-5,10	-1,56
	etil asetat 12,5 %	-2,333*	,454	,002	-4,10	-,56
	air 25 %	1,333	,454	,600	-,44	3,10
	air 12,5 %	3,000*	,454	,000	1,23	4,77
	kontrol	-12,667*	,454	,000	-14,44	-10,90
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	18,000*	,454	,000	16,23	19,77
air 25 %	ekstrak 50%	-1,333	,454	,600	-3,10	,44
	ekstrak 25 %	2,000*	,454	,013	,23	3,77
	ekstrak 12,5%	4,667*	,454	,000	2,90	6,44
	n-heksan 50%	6,667*	,454	,000	4,90	8,44
	n-heksan 25%	7,333*	,454	,000	5,56	9,10
	n-heksan 12,5%	7,667*	,454	,000	5,90	9,44
	etil asetat 50%	-5,667*	,454	,000	-7,44	-3,90
	etil asetat 25 %	-4,667*	,454	,000	-6,44	-2,90
	etil asetat 12,5 %	-3,667*	,454	,000	-5,44	-1,90
	air 50 %	-1,333	,454	,600	-3,10	,44
	air 12,5 %	1,667	,454	,092	-,10	3,44
	kontrol	-14,000*	,454	,000	-15,77	-12,23
	kotrimoksazol (+)					
	kontrol DMSO (-)	16,667*	,454	,000	14,90	18,44
air 12,5 %	ekstrak 50%	-3,000*	,454	,000	-4,77	-1,23
	ekstrak 25 %	,333	,454	1,000	-1,44	2,10
	ekstrak 12,5%	3,000*	,454	,000	1,23	4,77
	n-heksan 50%	5,000*	,454	,000	3,23	6,77
	n-heksan 25%	5,667*	,454	,000	3,90	7,44
	n-heksan 12,5%	6,000*	,454	,000	4,23	7,77
	etil asetat 50%	-7,333*	,454	,000	-9,10	-5,56

	etil asetat 25 %	-6,333*	,454	,000	-8,10	-4,56
	etil asetat 12,5 %	-5,333*	,454	,000	-7,10	-3,56
	air 50 %	-3,000*	,454	,000	-4,77	-1,23
	air 25 %	-1,667	,454	,092	-3,44	,10
	kontrol	-15,667*	,454	,000	-17,44	-13,90
	kotrimoksazol (+)					
	Kontrol DMSO (-)	15,000*	,454	,000	13,23	16,77
kontrol	ekstrak 50%	12,667*	,454	,000	10,90	14,44
Kotrimoksaol (+)	ekstrak 25 %	16,000*	,454	,000	14,23	17,77
	ekstrak 12,5%	18,667*	,454	,000	16,90	20,44
	n-heksan 50%	20,667*	,454	,000	18,90	22,44
	n-heksan 25%	21,333*	,454	,000	19,56	23,10
	n-heksan 12,5%	21,667*	,454	,000	19,90	23,44
	etil asetat 50%	8,333*	,454	,000	6,56	10,10
	etil asetat 25 %	9,333*	,454	,000	7,56	11,10
	etil asetat 12,5 %	10,333*	,454	,000	8,56	12,10
	air 50 %	12,667*	,454	,000	10,90	14,44
	air 25 %	14,000*	,454	,000	12,23	15,77
	air 12,5 %	15,667*	,454	,000	13,90	17,44
	Kontrol DMSO (-)	30,667*	,454	,000	28,90	32,44
kontrol DMSO (-)	ekstrak 50%	-18,000*	,454	,000	-19,77	-16,23
	ekstrak 25 %	-14,667*	,454	,000	-16,44	-12,90
	ekstrak 12,5%	-12,000*	,454	,000	-13,77	-10,23
	n-heksan 50%	-10,000*	,454	,000	-11,77	-8,23
	n-heksan 25%	-9,333*	,454	,000	-11,10	-7,56
	n-heksan 12,5%	-9,000*	,454	,000	-10,77	-7,23
	etil asetat 50%	-22,333*	,454	,000	-24,10	-20,56
	etil asetat 25 %	-21,333*	,454	,000	-23,10	-19,56
	etil asetat 12,5 %	-20,333*	,454	,000	-22,10	-18,56
	air 50 %	-18,000*	,454	,000	-19,77	-16,23
	air 25 %	-16,667*	,454	,000	-18,44	-14,90
	air 12,5 %	-15,000*	,454	,000	-16,77	-13,23

Kontrol	-30,667*	,454	,000	-32,44	-28,90
Kotrimoksazol (+)					

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

Homogeneous Subsets

		Diameter hambatan								
sampel		N	Subset for alpha = 0.05							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Tukey	Kontrol DMSO (-)	3	,00							
HSD ^a	n-heksan 12,5%	3		9,00						
	n-heksan 25%	3		9,33						
	n-heksan 50%	3		10,00						
	ekstrak 12,5%	3			12,00					
	ekstrak 25 %	3				14,67				
	air 12,5 %	3				15,00				
	air 25 %	3					16,67			
	ekstrak 50%	3					18,00			
	air 50 %	3					18,00			
	etil asetat 12,5 %	3						20,33		
	etil asetat 25 %	3						21,33	21,33	
	etil asetat 50%	3							22,33	
	kontrol	3								30,67
	kotrimoksazol (+)									
	Sig.		1,000	,631	1,000	1,000	,221	,631	,631	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media

1. Brain Heart Infusion (BHI)

Infus dari otak sapi	200,0 g
Infus dari hati sapi	250,0 g
Protese pepton	10,0 g
Dektrosa	2,0 g
NaCl	5,0 g
Dinatrium fosfate	5,0 g
Aquadest	ad 1000,0 ml
pH	7,4

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dilarutkan, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung pH 7,4. (Depkes 1994).

2. Formulasi dan pembuatan *Vogel Jhonson Agar* (VJA)

Peptone from casein	10,0 gram
Yeast extract	5,0 gram
di-potasium hydrogen phosphate	10,0 gram
D(-)mannitol	10,0 gram
Lithium chloride	5,0 gram
Glycine	10,0 gram
Phenol red	0,025 gram
Agar	13,0 gram

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada

suhu 121 °C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.
(Depkes 1994).

3. Formulasi dan pembuatan Moeler Hintlon (MHA)

Beef, dehydrated infusion	300 g
Casein Hydrolysate	17,5 g
Strach	1,5 g
Agar-agar	17 g

Suspensi 38 g bahan diatas dalam 1 liter aquadest, dipanaskan sampai larut sempurna, sterilisasi pada autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit
(Depkes 1994).