

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI
n-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI AKAR BIDARA
(*Zizyphus mauritiana* Lamk.) TERHADAP
Escherichia coli ATCC 25922**



Diajukan oleh:

**Ayu Rodia Ulfa
20144197A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI
n-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI AKAR BIDARA
(*Zizyphus mauritiana* Lamk.) TERHADAP
Escherichia coli ATCC 25922**

SKRIPSI

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

Oleh :



**Ayu Rodia Ulfa
20144197A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul

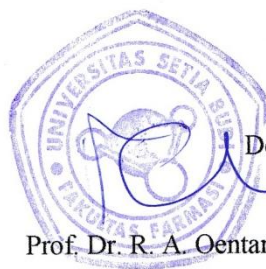
**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI
n-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI AKAR BIDARA
(*Zizyphus mauritiana* Lamk.) TERHADAP
Escherichia coli ATCC 25922**

Oleh :

Ayu Rodia Ulfa
20144197A

Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
Pada tanggal : Juli 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan,

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

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

Dra. Kartinah Wiryosoendjoyo, SU

Penguji :

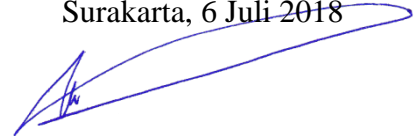
1. D. Andang Arif Wibawa, SP., M.Si 1.....
2. Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt 2.....
3. Desi Purwaningsih, S.Pd., M.Si 3.....
4. Dr. Drs. Supriyadi, M.Si 4.....

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu Perguruan Tinggi dan sepanjang sepengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dalam naskah ini dan disebut dalam daftar pustaka. Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian, karya ilmiah, atau skripsi orang lain.

Saya bersedia menerima sanksi baik secara akademis ataupun hukum. Demikian pernyataan ini saya buat dengan semestinya.

Surakarta, 6 Juli 2018

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized, elongated shape that appears to be the initials 'RU' followed by a long horizontal stroke.

Ayu Rodia Ulfa

PERSEMBAHAN

“Allah Tidak Membebani Seseorang Melainkan Sesuai Dengan Kadar Kesanggupannya” (Q.S Al-Baqarah: 286)

“Terimakasih teramat sangat untuk kalian Mamak dan Papak yang sudah melahirkan saya ke dunia ini, selalu membuat ku mampu berdiri tanpa kalian dampingi. Sekarang meski kalian tak mendampingi ku lagi untuk kehidupan didunia, ku harap kelak dikehidupan selanjutnya yang kekal kita bisa bersama lagi.”

**“Untuk adikku Wulan Rudiarti dan Meji
terimakasih kalian mungkin tanpa kalian aku tak akan sekuat ini”**

“Semua akan terlihat tidak mungkin sampai semuanya selesai”
(Nelson Mandela)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul “UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI AKAR BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922”. Skripsi ini disusun sebagai sebuah proses pembelajaran dan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan jenjang pendidikan Sarjana Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

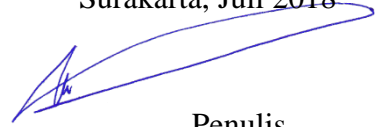
Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada :

1. Dr. Djoni Taringan, MBA, selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Sunarti, M.Sc, Apt, selaku pembimbing akademik yang senantiasa pembimbing dan memberi nasihat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
4. Dr. Drs. Supriyadi, selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu dalam membimbing, menasehati, mengarahkan dan memberikan semangat pada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Dra. Kartinah WS SU., selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu dalam membimbing dan keikhlasannya dalam memberikan ilmu serta semangat kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Segenap dosen dan staf laboratorium Universitas Setia Budi yang telah membantu dan membimbing penulis selama melaksanakan penelitian.
7. Ibu, Bapak, adik, dan semua keluarga ku yang telah memberikan dukungan dan atas doa kalian saya sampai disini,
8. Teman-teman yang tidak bisa disebutkan satu-persatu, selalu mendukung dan membantu hingga skripsi ini selesai. Semoga Allah SWT memberikan limpahan rahmat-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat kekurangan serta kesalahan yang tidak disadari penulis. Penulis mengharapkan saran dan kritik dari pembaca, demi kebaikan penulisan selanjutnya dimasa yang

akan datang. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kefarmasian.
Surakarta,

Surakarta, Juli 2018

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized, elongated shape with a small loop at the end.

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
INTISARI	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	2
C. Tujuan Penelitian	3
D. Kegunaan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Tanaman Bidara	4
1. Klasifikasi tanaman	4
2. Nama lain	4
3. Morfologi dan distribusi tanaman	4
4. Kandungan kimia	4
4.1 Alkaloid	5
4.2 Saponin	5
4.3 Steroid	6
4.4 Fenol	6
5. Khasiat bidara	6
A. Simplisia	6
1. Pengertian simplisia	6
2. Pengeringan	7
3. Tahap pembuatan simplisia	7
B. Penyarian	7
1. Ekstrak	7
2. Ekstraksi	8
3. Maserasi	8

4. Fraksinasi.....	9
5. Pelarut.....	9
5.1 Etanol.....	10
5.2 Etil asetat.....	10
5.3 <i>n</i> -heksana	10
5.4 Air.....	10
C. <i>Escherichia coli</i>	11
1. Sistematika <i>Escherihchia coli</i>	11
2. Morfologi dan identifikasi	11
3. Fisiologi <i>Escherichia coli</i>	12
4. Toksin <i>Escherichia coli</i>	12
5. Patogenesis.....	12
6. Pengobatan diare	13
D. Antibakteri	13
1. Pengertian antibakteri.....	13
2. Mekanisme kerja antibakteri.....	14
2.1 Penghambatan metabolisme sel	14
2.2 Penghambatan sintesis dinding sel	14
2.3 Penghambatan permeabilitas sel	14
2.4 Penghambatan sintesis protein	14
2.5 Penghambatan sintesis asam nukleat.....	15
E. Uji Aktivitas Antibakteri	15
1. Difusi	15
2. Dilusi	15
F. Siprofloxacina.....	16
G. Media.....	16
1. Pengertian	16
2. Macam-macam media	16
3. Klasifikasi media.....	17
3.1 Media sintetik.....	17
3.2 Media kompleks	17
3.3 Media anaerob.....	17
3.4 Media biakan khusus	17
3.5 Media selektif dan diferensial	17
H. Sterilisasi	18
I. Landasan teori.....	18
J. Hipotesis	20
BAB III METODE PENELITIAN.....	21

A. Populasi dan Sampel	21
B. Variabel Penelitian	21
1. Identifikasi variabel utama.....	21
2. Klasifikasi variabel utama.....	21
2.1 Variabel bebas	21
2.2 Variabel terkendali.....	21
2.3 Variabel tergantung.....	21
3. Definisi operasional variabel utama	22
A. Bahan dan Alat.....	23
1. Bahan	23
1.1 Bahan sampel	23
1.2 Bahan kimia.....	23
1.3 Bakteri uji.....	23
1.4 Medium	23
2. Alat	23
B. Jalannya Penelitian	23
1. Determinasi tanaman	24
2. Pembuatan serbuk.....	24
3. Penetapan susut pengeringan serbuk akar bidara (<i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk.).....	24
4. Pembuatan ekstrak etanol 70% akar bidara	24
5. Uji bebas etanol	25
6. Fraksinasi kandungan kimia.....	25
7. Identifikasi kandungan kimia	25
7.1 Identifikasi alkaloid	25
7.2 Identifikasi fenol.....	25
7.3 Identifikasi saponin.....	26
7.4 Identifikasi steroid	26
8. Sterilisasi.....	26
9. Identifikasi bakteri uji <i>Escherichia coli</i>	26
9.1 Identifikasi koloni <i>Escherichia coli</i>	26
9.2 Identifikasi mikroskopis <i>Escherichia coli</i> dengan pewarnaan Gram.....	26
10. Identifikasi bakteri uji secara biokimia	27
10.1 Media SIM (<i>Sulfide Indol Motility</i>)	27
10.2 Media KIA (<i>Kliger's Iron Agar</i>)	27
10.3 Media LIA (<i>Lysin Iron Agar</i>).....	27
10.4 Media Sitrat	28
11. Pembuatan suspensi bakteri uji	28
12. Pengujian aktivitas antibakteri akar bidara secara difusi.....	28

13. Pengujian antibakteri akar bidara secara dilusi	29
C. Analisis Data	30
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	35
1. Identifikasi tanaman akar bidara (<i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk.).....	35
2. Pembuatan serbuk akar bidara	35
3. Penetapan susut pengeringan serbuk akar bidara	36
4. Pembuatan ekstrak akar bidara.....	36
5. Hasil uji bebas etanol ekstrak akar bidara.....	37
6. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi akar bidara.....	37
7. Hasil identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	39
7.1 Hasil identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i> secara makroskopis	39
7.2 Hasil identifikasi mikroskopis bakteri <i>Escherichia coli</i>	39
7.3 Hasil identifikasi biokimia bakteri <i>Escherichia coli</i>	39
8. Pembuatan suspensi bakteri	42
9. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi etil asetat dari akar bidara dengan metode difusi.....	42
10. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi	44
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	45
A. Kesimpulan	45
B. Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara	32
Gambar 2. Skema uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air dari akar bidara terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara difusi	33
Gambar 3. Skema uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air dari akar bidara terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 secara dilusi	34

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah akar bidara	35
Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk akar bidara menggunakan alat <i>Moisture balance</i>	36
Tabel 3. Pembuatan ekstrak akar bidara	37
Tabel 4. Hasil uji bebas etanol ekstrak akar bidara	37
Tabel 5. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak, dan fraksi akar bidara.....	38
Tabel 6. Hasil identifikasi biokimia pada <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	40
Tabel 7. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksinasi akar bidara terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan metode difusi.....	42
Tabel 8. Hasil uji dilusi fraksi etil asetat dari akar bidara.....	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman bidara (<i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk.).....	54
Lampiran 2. Gambar akar dan serbuk akar bidara (<i>Zizyphus mauritiana</i> Lamk.)	55
Lampiran 3. Gambar alat yang digunakan	56
Lampiran 4. Hasil tes bebas etanol.....	59
Lampiran 5. Gambar ekstrak etanol dan fraksinasi	60
Lampiran 6. Gambar identifikasi kandungan senyawa kimia pada ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara	61
Lampiran 7. Hasil identifikasi bakteri uji	62
Lampiran 8. Hasil pembuatan suspensi bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	63
Lampiran 9. Gambar larutan stok dan hasil uji difusi.....	64
Lampiran 10. Hasil uji dilusi	67
Lampiran 11. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah akar bidara.....	68
Lampiran 12. Perhitungan persen rendemen ekstrak.....	69
Lampiran 13. Perhitungan persen rendemen fraksinasi akar bidara.....	70
Lampiran 14. Perhitungan dan pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksana,etil asetat dan air dari akar bidara.....	71
Lampiran 15. Perhitungan larutan stok fraksi etil asetat dari akar bidara metode dilusi.....	72
Lampiran 16. Hasil analisis Tukey dan tabel <i>Homogeneous Subsets</i>	78
Lampiran 17. Formulasi dan pembuatan media	88

INTISARI

ULFA, A.R., 2018, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI ESKTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI AKAR BIDARA (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI SURAKARTA.

Salah satu bagian tanaman bidara yang bisa dimanfaatkan sebagai antibakteri adalah akar bidara. Analisis fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak akar bidara mengandung alkaloid, fenolik, glikosida saponin dan steroid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari akar bidara terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Serbuk dari akar bidara diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan air. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dengan konsentrasi 50%, 25%, 25%, dan metode dilusi dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,57%, 0,79%, 0,40%, 0,20%, 0,10%. Analisis statistik menggunakan *one way* ANOVA dilanjutkan dengan uji Tukey.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Konsentrasi 50% pada fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri teraktif dengan diameter hambat 17 mm dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 6,25%.

Kata kunci : Akar bidara, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, *Escherchia coli*.

ABSTRACT

ULFA, A.R., 2018, ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF EXTRACT ETHANOL, FRACTION *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE AND WATER OF BIDARA ROOT (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) AGAINST *Escherichia coli* ATCC 25922, THESIS, FACULTY PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

One part bidara plants that can be used as an antibacterial is the root bidara. Phytochemical analysis showed that bidara root extract contains alkaloids, phenolics, saponin glycosides and steroids. This study aims to determine the antibacterial activity of ethanol extract, fraction of *n*-hexane, ethyl acetate and water from the roots bidara against *Escherichia coli* ATCC 25 922.

The powder from the roots bidara extracted with maceration method using ethanol 70%, fractionation using *n*-hexane, ethyl acetate, and water. Antibacterial activity test was carried out using the diffusion method with a concentration of 50%, 25%, 25%, and dilution method with a concentration of 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,57%, 0,79%, 0,40%, 0,20%, 0,10%. Statistical analysis using one-way ANOVA followed by Tukey's test.

The results showed that ethanol extract, fraction of *n*-hexane, ethyl acetate, and water from the roots bidara has antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922. Concentration of 50% ethyl acetat fraction had the most effectif antibacterial activity with inhibitory diameter 17 mm and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of 6,25% against *Escherichia coli* ATCC 25922.

Keywords: Bidara roots, *Escherichia coli* , ethanol extract, fraction of *n*-hexane, ethyl acetate fraction, the fraction of water.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk di negara berkembang termasuk Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri (Radji 2010). Diare adalah infeksi yang menyebabkan frekuensi defekasi melebihi frekuensi normal. Konsentrasi feses encer bahkan bercampur lendir dan darah. *Escherichia coli* adalah salah satu penyebab diare akut baik anak-anak maupun orang dewasa, karena mengkonsumsi air atau makanan yang tercemar oleh *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan infeksi pada usus dan dapat menyebabkan diare (Jawetz *et al.* 2007).

Escherichia coli adalah salah satu jenis bakteri Gram negatif. *Escherichia coli* banyak ditemukan di usus besar manusia dengan flora normal. Bakteri ini dapat berubah menjadi patogen jika pertumbuhan di dalam tubuh melebihi batas normal, akibat perubahan makanan secara mendadak serta perubahan pH dalam usus misalnya diare, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain (Cahyono 2013). Walaupun penanganan penyakit diare telah menggunakan antibiotik yang direkomendasikan oleh Puskesmas atau Instansi Kesehatan tetapi pada kenyataannya jumlah kasus diare cenderung meningkat. Hal ini disebabkan oleh sanitasi, dan kemungkinan terjadinya resistensi (Sasongko 2014).

Lebih dari 20.000 jenis tumbuhan obat tumbuh dan berkembang di Indonesia. Baru 1.000 jenis saja yang sudah didata dan sekitar 300 jenis yang sudah dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional (Hariana 2006). Keanekaragaman tanaman yang berkhasiat sebagai obat diantaranya mempunyai nama yang sama walaupun jenisnya berbeda. Hal tersebut disebabkan oleh beberapa tumbuhan belum teridentifikasi secara lengkap dan belum banyak ragam yang diketahui masyarakat. Selain itu, tumbuhan obat merupakan potensi kekayaan yang perlu dilindungi karena dapat dimanfaatkan sebagai pendukung perekonomian rakyat Indonesia (Hariana 2006).

Pengobatan tradisional sudah ada di Indonesia, jauh sebelum pelayanan kesehatan dengan obat-obatan modern dikenal masyarakat. Pengobatan tradisional dengan memanfaatkan tumbuhan berkhasiat obat merupakan pengobatan yang dimanfaatkan dan diakui masyarakat dunia, yang menandai kesadaran untuk kembali ke alam (*back to nature*) adalah untuk mencapai kesehatan optimal dan untuk mengatasi berbagai penyakit secara alami (Wijayakusuma 2000). Obat tradisional yang berasal dari tumbuhan memiliki efek samping dan resiko yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan obat kimia (Muhlisah 2005).

Tanaman obat yang bisa dikembangkan sebagai antibakteri adalah tanaman bidara. Salah satu bagian tanaman bidara yang bisa dimanfaatkan sebagai antibakteri adalah akar bidara. Analisis fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak akar bidara mengandung alkaloid, fenolik, glikosida saponin dan steroid (Upadhyay *et al.* 2015). Ekstrak akar *Zizyphus mauritiana* Lamk. menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap Gram positif (*B. subtilis* dan *S. aureus*) dan bakteri Gram negatif (*E. coli*, dan *P. aeruginosae*) (Upadhyay *et al.* 2015).

Berdasarkan uraian di atas peneliti tertarik untuk melakukan penelitian penggunaan ekstrak etanol 70% akar bidara terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang merupakan salah satu bakteri penyebab diare.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka masalah penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut:

Pertama, apakah ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922?

Kedua, manakah dari fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang mempunyai aktivitas antibakteri yang paling aktif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922?

Ketiga, berapa Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) hasil fraksi teraktif dari ekstrak etanol 70% akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

Pertama, untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, untuk mengetahui aktivitas antibakteri yang paling aktif dari fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif dari ekstrak etanol 70% akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, informasi dan wawasan kepada masyarakat tentang akar bidara untuk mengatasi penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Masyarakat bisa lebih memanfaatkan tanaman ini untuk pengobatan tradisional dan menambah informasi tentang tanaman obat yang ada di Indonesia. Penelitian ini diharapkan berguna bagi peneliti lain sebagai acuan tambahan informasi dalam melakukan penelitian terhadap akar bidara sebagai antibakteri.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Bidara

1. Klasifikasi tanaman

Klasifikasi secara lengkap tanaman bidara adalah sebagai berikut (Upadhyay *et al.* 2012)

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Classis	: Magnoliopsida
Ordo	: Rosales
Familia	: Rhamnaceae
Genus	: <i>Ziziphus</i>
Species	: <i>Ziziphus mauritiana</i> Lamk.

2. Nama lain

Bidara yang memiliki nama lain *Ziziphus mauritiana* Lamk. dikenal dengan beberapa nama daerah yaitu widara (Jawa, Sunda), rangga (Bima), kalangga (Sumba) dan bekul (Bali) (Heyne 1987).

3. Morfologi dan distribusi tanaman

Ziziphus mauritiana Lamk. adalah semak pohon berduri dengan tinggi hingga 15 m, diameter batang 40 cm atau lebih. Kulit batang abu-abu gelap atau hitam, pecah-pecah tidak beraturan. Daun tunggal dan berselang-seling, memiliki panjang 4-6 cm dan lebar 2,5-4,5 cm. Tangkai daun berbulu dan pada pinggirannya terdapat gigi yang sangat halus. Buah berbiji satu, bulat sampai bulat telur, ukuran kira-kira 6-4 cm, kulit buah halus atau kasar, mengkilap, berwarna kekuningan sampai kemerahan atau kehitaman, daging buah putih, renyah, agak asam hingga manis (Goyal *et al.* 2012). *Ziziphus mauritiana* Lamk. tumbuh liar di seluruh Jawa dan Bali pada ketinggian di bawah 400 meter dari permukaan laut. Tanaman ini tumbuh pada daerah dengan suhu ekstrim dan tumbuh subur pada daerah dengan kondisi kering (Heyne 1987; Steenis *et al.* 2005).

4. Kandungan kimia

Analisis fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak akar bidara mengandung alkaloid, fenolik, saponin, dan steroid (Upadhyay *et al.* 2015).

4.1 Alkaloid. Alkaloid mencakup senyawa yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom N, biasanya dalam gabungan sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid biasanya berbentuk kristal, hanya sedikit yang berupa cairan, dan dapat dideteksi dengan pereaksi Dragendroff (Maharani *et al.* 2014). Kemampuan senyawa alkaloid sebagai antibakteri dilakukan dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel pada bakteri tersebut (Alamsyah & Kurniawan 2014).

4.2 Saponin. Saponin adalah glikosida yang banyak terdapat dalam tanaman dicirikan dengan rasa pahit, berbusa dan bersifat hemolisis terdapat pada sel darah merah. Saponin sangat toksik bagi ikan dan hewan air lainnya tetapi efeknya terhadap hewan yang lebih tinggi bervariasi. Saponin ini berperan dalam aktivitas antibakteri (Zuhud *et al.* 2001). Senyawa saponin dapat merusak membran. Rusaknya membran sitoplasma dapat mengakibatkan sifat permeabilitas membran sel berkurang sehingga transport zat ke dalam sel dan keluar sel menjadi tidak terkontrol. Zat yang berada di dalam sel seperti ion organik enzim, asam amino dan nutrisi dapat keluar dari sel. Apabila enzim-enzim tersebut keluar dari sel bersama dengan zat-zat seperti air dan nutrisi dapat menyebabkan metabolisme terhambat sehingga terjadi penurunan ATP yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan sel, selanjutnya pertumbuhan sel bakteri menjadi terhambat dan menyebabkan kematian sel (Antika *et al.* 2014).

4.3 Steroid. Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung siklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Dahulu sering digunakan sebagai hormon kelamin asam empedu, dll. Tetapi pada tahun-tahun terakhir ini makin banyak senyawa steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan (Robinson 1995; Harborne 2006). Mekanisme steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan

membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom (Madduluri 2013).

4.4 Fenol. Fenol mampu berperan sebagai senyawa antibakteri karena fenol mampu melakukan migrasi dari fase cair ke fase lemak yang terdapat pada membran sel yang menyebabkan turunnya tegangan permukaan membran sel (Rahayu 2000). Selanjutnya, mendenaturasi protein dan mengganggu fungsi membran sel sebagai lapisan yang selektif, sehingga sel menjadi lisis (Jawetz *et al.*1995).

5. Khasiat bidara

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

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia atau herbal adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan. Kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan simplisia tidak lebih dari 60°C. Simplisia dibagi menjadi 3 macam, yaitu: simplisia nabati, simplisia hewani, simplisia mineral. Nama latin simplisia ditetapkan dengan menyebut nama marga (genus), nama jenis (spesies), dan bila memungkinkan petunjuk jenis (varietas) diikuti dengan bagian yang digunakan (DepKes RI 2008).

2. Pengerinan

Pengerinan simplisia bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Penurunan mutu atau perusakan simplisia akan dicegah dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik. Pengerinan simplisia dilakukan dengan menggunakan alat pengering. Saat pengerinan yang diperhatikan adalah suhu pengerinan, kelembapan udara, aliran udara, waktu pengerinan dan luas permukaan bahan, sehingga simplisia tidak mudah rusak dan kandungan kimia yang berkhasiat tidak berubah karena proses fermentasi (Gunawan & Mulyani 2004).

3. Tahapan pembuatan simplisia

Proses pembuatan simplisia memiliki beberapa tahapan. Tahapan itu dimulai dari pengumpulan bahan baku untuk menentukan kualitas bahan baku. Langkah selanjutnya sortasi basah yaitu pemilihan hasil panen ketika tanaman masih segar. Lalu dilakukan pencucian yang berguna untuk membersihkan kotoran yang melekat terutama untuk bahan-bahan yang tercemar peptisida. Pengerinan bertujuan untuk menurunkan kadar air sehingga bahan tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang bisa menguraikan lebih lanjut kandungan aktif, kemudian sortasi kering yaitu pemilihan bahan setelah mengalami proses pengerinan. Langkah terakhir adalah pengepakan dan penyimpanan, disimpan dalam rak pada gudang penyimpanan (DepKes RI 2007).

C. Penyarian

1. Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (DepKes RI 2000).

2. Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Kelarutan dan stabilitas senyawa pada simplisia terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat dan derajat keasamaan dipengaruhi oleh struktur kimia yang berbeda-beda (DepKes RI 2000). Simplisia yang lunak seperti rimpang, akar dan daun mudah diserap oleh pelarut, sehingga pada proses ekstraksi tidak perlu diserbuk sampai halus. Sedangkan simplisia yang keras seperti biji, kulit kayu, dan kulit akar susah diserap oleh pelarut, karena itu perlu diserbuk sampai halus, selain sifat fisik dan senyawa aktif dari simplisia, senyawa-senyawa yang terdapat dalam simplisia seperti protein, karbohidrat, lemak dan gula juga harus diperhatikan (DepKes RI 2000).

Tujuan utama ekstraksi adalah mendapatkan atau memisahkan sebanyak mungkin zat-zat yang memiliki khasiat pengobatan dari zat-zat yang tidak berguna, supaya lebih mudah digunakan dan disimpan dibandingkan simplisia asal dan tujuan pengobatannya lebih terjamin (Syamsuni 2007).

3. Maserasi

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

Maserasi berasal dari bahasa latin *Macerace* berarti mengairi dan melunakkan. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Dasar dari maserasi adalah melarutnya bahan kandungan simplisia dari sel yang rusak, yang terbentuk pada saat penghalusan, ekstraksi (difusi) bahan kandungan dari sel yang masih utuh. Setelah selesai waktu maserasi, artinya keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan masuk kedalam cairan, telah tercapai maka proses difusi segera berakhir. Proses ekstraksi dihentikan ketika

tercapai keseimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani 2014).

Selama maserasi atau proses perendaman dilakukan pengocokan berulang-ulang. Upaya ini menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat didalam cairan. Sedangkan keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolut. Semakin besar perbandingan simplisia terhadap cairan pengekstraksi, akan semakin banyak hasil yang diperoleh (Voigt 1994). Keuntungan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugian maserasi adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (DepKes RI 1986).

4. Fraksinasi

Fraksinasi diperlukan karena ekstrak etanol sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama, kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya, jumlah dan jenis senyawanya yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, semi polar akan masuk ke pelarut semi polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (Tiwari *et al.* 2011; Mukhriani 2014).

5. Pelarut

Pelarut adalah cairan yang digunakan untuk ekstraksi. Pemilihan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi bahan obat tertentu berdasarkan daya larut yang aktif, zat yang tidak aktif serta yang tidak diinginkan tergantung preparat yang digunakan (Ansel 1989). Penyarian ekstrak akar bidara dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan dilanjutkan dengan fraksinasi *n*-heksana, etil asetat, dan air. Pelarut etanol 70% digunakan karena merupakan penyari serbaguna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan

(Harborne 1987). Penggunaan pelarut yang berbeda polaritasnya disebabkan kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam akar bidara mempunyai polaritas yang berbeda-beda sehingga dengan dilakukan fraksinasi akan diketahui fraksi yang paling efektif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

5.1 Etanol. Etanol dapat melarutkan senyawa-senyawa seperti tanin, alkaloid basa, saponin, minyak atsiri, kurkumin, antrakuinon, flavonoid, steroid, dan glikosida. Etanol sebagai penyari dapat memperbaiki stabilitas bahan-bahan terlarut, karena etanol mempunyai sifat yang mampu menghambat enzim, kapang, dan kuman sulit tumbuh dalam etanol lebih dari 20%. (DepKes RI 1986). Pelarut etanol lebih mudah menembus membran sel untuk mengekstrak bahan intraseluler dari bahan tanaman. Hampir semua komponen diidentifikasi dari tanaman yang aktif terhadap mikroorganisme adalah senyawa organik aromatik atau jenuh, mereka paling sering diperoleh melalui etanol atau ekstraksi metanol. Metanol lebih polar daripada etanol, tetapi metanol bersifat sitotoksik jika digunakan untuk aktivitas antibakteri dan akan mengakibatkan salah hasil pada beberapa jenis penelitian (Tiwari *et al.* 2011).

5.2 Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut semi polar, mudah menguap dan mudah terbakar, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup dan terlindung panas. Etil asetat merupakan cairan jernih tidak berwarna pada suhu kamar dengan bau khas seperti buah, larut dalam 15 bagian air bercampur etanol dan eter. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut ini adalah alkaloid. Etil asetat dapat juga melarutkan senyawa-senyawa fenolik seperti: fenol, asam fenolat, fenil propanoid, dan antrakuinon (Harborne 1987).

5.3 *n*-heksana. *n*-heksana adalah hasil dari penyulingan minyak tanah yang telah bersih, terdiri atas suatu campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna, transparan, bersifat mudah terbakar, baunya khas, tidak dapat larut dengan air, dapat larut dengan alkohol, benzene, kloroform dan eter. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksana yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti terpenoid, triterpenoid, sterol, dan fenil propanoid (Tiwari *et al.* 2011).

5.4 Air. Air adalah pelarut universal, yang digunakan untuk ekstrak tanaman dengan produk aktivitas antimikroba. Ekstrak tumbuh tumbuhan organik

dari pelarut telah memberikan aktivitas antimikroba yang lebih konsisten dibandingkan dengan ekstrak air. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan karena zat aktif ikut tersari sehingga zat lain yang diperlukan mengganggu proses penyarian (Tiwari *et al.* 2011).

D. *Escherichia coli*

1. Sistematika *Escherichia coli*

Menurut (Hardjoeno 2007) *Escherichia coli* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Divisio	: Proteobacteria
Classis	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

2. Morfologi dan identifikasi

Escherichia coli termasuk dalam famili Enterobacteriaceae yang berupa bakteri Gram negatif dan merupakan flora normal yang banyak ditemukan di saluran usus manusia. Bakteri ini berbentuk batang pendek (kokobasil), berderet seperti rantai, mempunyai flagel, berukuran 0,4 µm- 0,7 µm dan mempunyai simpai, pada biakan *Endo Agar* akan membentuk koloni berwarna merah dengan kilap logam yang permanen. *Escherichia coli* tumbuh dengan baik hampir disemua media pembedahan, dapat meragi laktosa atau memecahkan karbohidrat dengan membentuk asam dan gas (Maksum 2002). *Escherichia coli* dapat hidup soliter maupun berkoloni, umumnya motil, tidak membentuk spora, serta fakultatif anaerob (Carter & Wise 2004).

Escherichia coli merupakan mikroba dari kelompok koliform. Mikroba dari kelompok koliform secara keseluruhan tidak umum hidup atau terdapat di air, makanan maupun minuman, sehingga keberadaannya dapat dianggap sebagai petunjuk terjadinya pencemaran kotoran dalam arti luas, baik dari kotoran hewan

maupun manusia (Purnawijayanti 2001). Sebagian besar penyakit dari daging yang terkontaminasi. Penularan penyakit dapat terjadi melalui kontak langsung dan biasanya terjadi di tempat yang memiliki sanitasi dan lingkungan yang kurang bersih (Jawetz *et al.* 2012).

3. Fisiologi *Escherichia coli*

Escherichia coli bersifat lateral yaitu peritrik dimana flagel tersebar dari ujung-ujung sampai pada sisi. Rata-rata pergerakan bakteri *Escherichia coli* kira-kira 25 μ /detik atau 10 cm/jam. Flagel berguna untuk bergerak, melekat, dan konjugasi. *Escherichia coli* berada dalam medium yang mengandung sumber karbon maka akan mengubah derajat asam (pH) dalam medium menjadi asam dan akan membentuk gas sebagai hasil proses terurainya glukosa menjadi senyawa lain (Jawetz *et al.* 2012).

4. Toksin *Escherichia coli*

Escherichia coli menghasilkan enterotoksin yang disebut *Enterotoksigenik Escherichia coli* (ETEC) dan mempunyai kemampuan untuk memasuki epitel usus yang disebut dengan *Enteroinvasif Escherichia coli* (EIEC). Keadaan kurang baik seperti premature, usia tua, terserang penyakit, dan setelah imunisasi, bakteri *Escherichia coli* dapat mencapai saluran darah dan terjadi sepsis. *Escherichia coli* diekstraksi dalam jumlah yang besar di dalam feses menyebabkan kontaminasi lingkungan termasuk tanah (Jawetz *et al.* 2012).

5. Patogenesis

Escherichia coli bersifat komersial dan masuk dalam salah satu bakteri indikator sanitasi. Infeksi bakteri tersebut diduga merupakan faktor utama penyebab malnutrisi pada bayi dan anak-anak di negara berkembang, *Escherichia coli* patogenik banyak mencemari daging sapi, susu, air tanpa proses, buah, dan sayuran mentah (Kusumaningsih 2010). Beberapa strain dari *Escherichia coli* selama proses evolusi mendapat kemampuan virulensi yang membantu mereka menginfeksi *host*. Jenis *Escherichia coli* yang patogen tersebut dapat mengakibatkan gangguan intestinal dan infeksi saluran kemih (Prescott 2008). Pada tahun 1982 pertama kali dilaporkan terjadinya wabah diare berdarah disebabkan oleh *Escherichia coli* O157:H7 pada 20.000 orang dengan kematian

sebanyak 250 orang, akibat mengkonsumsi hamburger setengah matang dari restoran cepat saji di Amerika Serikat, gejala umum infeksi *Escherichia coli* diantaranya diare berdarah, mual muntah, nyeri abdomen, dan kram perut. Infeksi *Escherichia coli* pada bayi, anak-anak, lanjut usia, pada seseorang dengan sistem kekebalan tubuh yang rendah (penderita HIV/AIDS), dapat menimbulkan komplikasi yang menyebabkan kematian (Kusumaningsih 2010).

6. Pengobatan diare

Pengobatan diare dapat diberikan setelah mengetahui penyebab yang pasti. Obat antibiotik dapat diberikan jika pemeriksaan laboratorium ditemukan bakteri patogen (Suraatmaja 2007). Oralit merupakan terapi pengobatan simptomatik diare yang tidak disebabkan oleh infeksi atau tidak disertai panas dan simtom sistemik. Oralit berfungsi mencegah dehidrasi yang sangat berbahaya bagi penderita diare, terutama bayi dan lansia (Priyanto & Lestari 2009).

Infeksi oleh *Escherichia coli* dapat diobati menggunakan antibiotik siprofloksasin, kotrimoksazol, metronidazol, injeksi gentamisin, dan amoksisilin. Antibiotik golongan fluoroquinolon seperti halnya ciprofloxacin yang terikat pada subunit β enzim DNA gyrase, dan memblok aktivitas enzim yang essensial dalam menjaga supercoiling DNA dan penting dalam proses replikasi DNA.

E. Antibakteri

1. Pengertian antibakteri

Antibakteri adalah bahan yang digunakan untuk mengobati penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri baik yang bersifat menghambat pertumbuhan maupun membunuh bakteri patogen tersebut. Suatu antibakteri dapat digunakan apabila menghambat atau membunuh bakteri patogen tanpa merusak tubuh hospes (Burton & Engelkirk. 2004).

2. Mekanisme kerja antibakteri

Mekanisme kerja antibakteri dari senyawa diantaranya yaitu menghambat metabolisme sel bakteri, menghambat sintesis dinding sel bakteri, mengganggu

permeabilitas membran sel bakteri, menghambat sintesis protein sel bakteri, menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri (Jawetz *et al.* 1986).

2.1 Penghambatan metabolisme sel. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari para amino benzoate (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan 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 2005).

2.2 Penghambatan sintesis dinding sel. Dinding sel bakteri terdiri dari polipeptidoglikan. Dimana polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer glikopeptida. Salah satu kerja antibakteri adalah menghambat sintesis dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Ganiswara 2005).

2.3 Penghambatan permeabilitas membran sel. Mengganggu permeabilitas membran sel bakteri. Membran biologi terdiri dari lipid, protein, dan lipoprotein. Membran sel berperan sebagai pembatas (*barrier*) difusi molekul air, ion, nutrien, dan sistem transport membran memelihara integritas komponen selular. Kerusakan pada membran ini mengakibatkan terhambatnya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alaminya (Ganiswara 2005).

2.4. Penghambatan sintesis protein. Menghambat sintesa protein sel bakteri. Dalam hidupnya bakteri mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Berbagai macam enzim yang berada di dalam sel merupakan sasaran potensial bagi kerjanya suatu penghambat. Beberapa agen bakteri bertindak menghambat fungsi ribosom. Ribosom bakteri mengandung dua sub unit yaitu sub unit 50S dan 30S, dan ini memungkinkan untuk tempat aksi antibiotik untuk satu sub unit atau keduanya (Ganiswara 2005).

F. Uji Aktivitas Antibakteri

1. Metode difusi

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi. Metode difusi dilakukan dengan menggunakan cakram (disk) kertas saring, sumuran atau silinder tidak beralas. Metode dengan sumur atau silinder, dilakukan dengan memasukkan larutan uji dengan konsentrasi tertentu ke dalam sumuran. Metode cakram kertas saring berisi sejumlah obat yang ditempatkan pada permukaan medium padat, medium sebelum diolesi bakteri uji. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat (Jawetz *et al.* 2012). Keuntungan metode difusi adalah dapat dengan mudah menentukan potensi antibakteri mengukur diameter zona radikal dan zona iradikal dibanding dengan metode dilusi yang pengamatannya sulit karena warna ekstrak sangat berpengaruh. Kekurangan metode ini adalah aktivitas antibakterinya dapat dipengaruhi oleh tebal tipisnya medium dan faktor difusibilitas obat karena suspensi bakteri tidak tersebar merata seperti metode dilusi (Jawetz *et al.* 1986).

2. Metode dilusi

Metode dilusi digunakan untuk mengukur Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penanaman mikroba uji ataupun agen mikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi 2008). Keuntungan metode ini yaitu konsentrasi agen mikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi 2008). Kekurangan metode ini adalah hanya dapat digunakan untuk mengisolasi organisme yang dominan dalam suatu populasi campuran (Jawetz *et al.* 2012).

G. Siprofloksasin

Siprofloksasin dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan pengobatan pertama pada infeksi yang disebabkan karena digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif, seperti *E.coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella sp*, *Shigella sp*, *Enterobacter*, *Haemophylus sp*, *Chlamydia sp*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, serta bakteri Gram-positif tertentu, seperti *Staphylococcus sp* dan *Streptococcus sp*. (Siswandono, 2008). Mekanisme kerja pada antibiotik siprofloksasin dengan menghambat sintesis asam nukleat dimana antibiotik golongan ini dapat masuk ke dalam sel dengan cara difusi pasif melalui kanal protein terisi air (porins) pada membran luar bakteri secara intra seluler, secara unik obat-obat ini menghambat replikasi DNA bakteri dengan cara mengganggu kerja DNA gyrase (topoisomerase II) selama pertumbuhan dan reproduksi bakteri.

H. Media

1. Pengertian

Media yaitu bahan-bahan yang terdiri dari zat kimia organik atau anorganik yang telah melalui proses pengolahan tertentu dan dapat digunakan untuk menumbuhkan atau mengembangbiakan mikroba. Syarat media yang digunakan dalam mikrobiologi harus mengandung unsur-unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba. Media harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba. Media harus dalam keadaan steril artinya sebelum ditanami mikroba yang dimaksud, tidak ditumbuhi mikroba lain (Abdurahman 2008).

2. Macam-macam media

Bentuk media ada tiga jenis yaitu media padat, media cair, dan media semi padat atau semi cair. Pertama media padat. Bahan media padat ditambahkan antara 12-15 gram tepung agar-agar per 1000 ml media. Media ini pada umumnya dipergunakan untuk bakteri, ragi, jamur, dan kadang-kadang juga mikroalga. Kedua, media cair. Media cair tidak ditambahkan zat pematat, biasanya media cair dipergunakan untuk pembiakan mikroalga tetapi juga mikroba lain, terutama

bakteri dan ragi. Ketiga, media semi padat atau semi cair. Penambahan zat pematid dalam media ini hanya 50% atau kurang dari seharusnya. Media ini umumnya dipergunakan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup anaerob atau fakultatif (Suriawiria 2005).

3. Klasifikasi media

3.1 Media sintetik. Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri kemoheterotrof. Pada uji kadar vitamin secara mikrobiologis media yang digunakan harus mengandung semua faktor pertumbuhan yang dibutuhkan oleh bakteri kecuali vitamin yang diuji. Media, bahan media, dan bakteri yang kemudian disatukan, lalu bakteri diamati. Pertumbuhan bakteri yang sebanding dengan kadar asam laktat yang dihasilkan bakteri akan sebanding dengan jumlah vitamin dalam bahan uji (Radji 2011).

3.2 Media kompleks. Media ini mengandung nutrisi tinggi, yang terdiri atas ekstrak ragi, ekstrak daging, tumbuhan, ataupun protein dari sumber lain. Vitamin, mineral, dan bahan organik diperoleh dari ekstrak daging maupun ragi yang merupakan sumber nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Media kompleks yang berbentuk cairan adalah *Nutrient Broth*, sedangkan yang ditambahkan media agar disebut *Nutrient Agar* (Radji 2011).

3.3 Media anaerob. Bakteri anaerob ditanam pada media spesial disebut *reducing media* yang menggunakan natrium thioglikolat. Media ini sebelum digunakan dipanaskan perlahan-lahan untuk menghilangkan oksigen yang terserap. Bejana anaerob digunakan untuk menginkubasi bakteri anaerob yang diinokulasi dalam media agar di dalam cawan petri (Radji 2011).

3.4 Media biakan khusus. Media ini digunakan untuk menentukan tipe pertumbuhan mikroba dan kemampuannya untuk mengadakan perubahan kimia tertentu. Bakteri aerob membutuhkan O₂ dengan konsentrasi lebih tinggi ataupun lebih rendah dari pada konsentrasi CO₂ di udara (Radji 2011).

3.5. Media selektif dan diferensial. Media selektif dan diferensial digunakan untuk mendeteksi ada tidaknya bakteri spesifik yang berhubungan dengan penyakit atau sanitasi yang buruk. Media selektif digunakan untuk menekan pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan, contoh *Bismuth Sulfite Agar*

digunakan untuk mengisolasi bakteri *Salmonella thypi* pada tinja. Media diferensial memudahkan perbedaan koloni bakteri yang diinginkan dari koloni lain yang tumbuh pada lempeng media yang sama (Radji 2011).

I. Sterilisasi

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

Bahan atau peralatan yang dipergunakan di dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu atau merusak media ataupun mengganggu kehidupan dan proses yang sedang dikerjakan (Suriawiria 2005). Media yang digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan beacker glass disterilkan dengan oven suhu 170°-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanas api langsung sterilisasi di inkas menggunakan formalin (Denyer 2004).

J. Landasan Teori

Tanaman bidara memiliki beberapa bagian diantaranya adalah buah, daun, ranting daun, akar, batang, dan bunga dimana tanaman ini banyak dimanfaatkan sebagai makanan terutama buah yang dimakan segar dan sebagai pengobatan tradisional. Ketersediaan tanaman ini banyak ditemukan di daerah subtropis seperti Indonesia dan dengan nutrisi yang tinggi menjadikan tanaman bidara banyak dimanfaatkan oleh masyarakat. Tanaman bidara yang telah digunakan sebagai obat tradisional diambil dari buah, daun, kulit batang, dan akar.

Penelitian yang dilakukan oleh Upadhyay *et al.* (2015) menunjukkan bahwa ekstrak dari akar bidara memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Akar bidara mengandung alkaloid, fenolik, glikosida saponin, dan steroid (Upadhyay *et al.* 2015). Kandungan akar bidara yang diduga memiliki aktivitas antibakteri adalah fenolik. Ekstrak akar bidara diperoleh dengan menggunakan metode maserasi yang merupakan penyarian sederhana dengan cara kerja merendam serbuk simplisia ke dalam larutan penyari. Etanol dapat menghambat kerja enzim, tidak menyebabkan pembengkakan sel, dan pada etanol yang lebih dari 20% ke atas akan sulit ditumbuhi kapang dan kuman. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, glikosida, steroid, tanin, minyak atsiri, dan kurkumin (DepKes. 1986). Ekstrak etanol yang diperoleh, kemudian difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana merupakan pelarut non polar yang melarutkan minyak lemak dan asam lemak, steroid, triterpenoid, karetenoid, dan fenil propanoid (Kristijono 2008). Etil asetat merupakan pelarut semi polar yang dapat melarutkan flavonoid, alkaloid, senyawa-senyawa fenolik seperti asam fenolat, fenol-fenol, fenil propanoid, antrakuinon, dan xanton (Harborne 2006). Senyawa yang dapat larut dalam air adalah flavonoid, saponin, dan tanin (DepKes 1986).

Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi. Metode difusi dilakukan dengan menggunakan kertas cakram (disk). Hasil daya uji antibakteri didasarkan pada pengukuran Diameter Daerah Hambat (DDH) pertumbuhan bakteri yang terbentuk di sekeliling kertas cakram, keuntungan metode difusi adalah ekonomis, sederhana (mudah dibuat), dan reproduksibel (Jawetz *et al.* 2005). Metode yang digunakan untuk pengujian aktivitas bakteri yaitu metode dilusi dengan menggunakan 1 deret tabung yang berisi 12 tabung dengan kadar yang menurun secara bertahap kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Keuntungan metode ini adalah memberikan hasil kualitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk membunuh bakteri (Jawetz *et al.* 1986).

K. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori yang ada, maka dapat disusun hipotesis bahwa:

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, dapat ditentukan aktivitas antibakteri yang paling aktif dari fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, dapat ditentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif ekstrak etanol akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar dari tanaman bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang diambil pada bulan Januari 2018 dari Singaraja, Bali. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar dari tanaman bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) diambil secara acak dengan memilih akar yang segar, bebas dari hama dan diperoleh dari Singaraja, Bali.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama adalah ekstrak etanol 70% dari akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.).

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari yang dianggap mempengaruhi selain variabel tergantung. Variabel terkontrol merupakan variabel yang dianggap mempengaruhi selain variabel bebas. Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini.

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol akar bidara, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air.

2.2 Variabel terkontrol. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, kondisi laboratorium meliputi : kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril, media yang digunakan dalam penelitian, tempat tumbuh tanaman, waktu panen, dan metode ekstraksi.

2.3 Variabel tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol 70% akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) adalah akar yang segar, bebas dari hama, dan diambil dari Singaraja, Bali pada bulan Januari 2018.

Kedua, serbuk akar bidara adalah serbuk akar bidara yang diambil kemudian dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, kemudian dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 40°C lalu dibuat serbuk dengan alat penyerbuk, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol akar bidara adalah hasil dari ekstraksi serbuk akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang diekstraksi dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah ekstrak etanol akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut non-polar.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu fraksi *n*-heksana yang kemudian difraksinasi dengan pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar.

Keenam, fraksi air adalah residu fraksi etil asetat yang kemudian diuapkan diwaterbath.

Ketujuh, *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah bakteri yang didapat dari Laboratorium Universitas Setia Budi.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri adalah uji dengan metode difusi cakram dengan melihat zona hambat pertumbuhan bakteri untuk menentukan fraksi teraktif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kesembilan, uji aktivitas antibakteri dari fraksi teraktif dengan metode dilusi untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang diambil dari Singaraja, Bali.

1.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, *n*-heksana, etil asetat, aquadest steril, DMSO 5%, HCl 2N, H₂SO₄ pekat, FeCl₃, serbuk Mg, larutan mayer, larutan Dragendroff, safranin (Gram D), alkohol (Gram C), larutan kristal violet (Gram A), larutan mordant (Gram B), reagen Ehrlich A, dan reagen Ehrlich B.

1.3 Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.4 Medium. Medium yang digunakan adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Endo Agar* (EA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Klinge's Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Simmons Citrat Agar* (SCA), standar Mc Farland 0,5.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat penyerbuk, ayakan nomor 40 timbangan analitik, mikropipet, seperangkat alat *vacuum rotary evaporator*, labu takar, gelas ukur, batang pengaduk, cawan penguap, seperangkat alat *Moisture Balance*, seperangkat alat *Sterling Bidwell*, autoklaf, inkubator, entkas, jarum ose, kapas lidi steril, tabung reaksi, rak tabung reaksi, oven, lampu spiritus, cawan petri, beaker glass, pipet ukur, penggaris, kertas saring, kain flanel, dan pinset.

D. Jalannya Penelitian

Akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) diambil yang masih segar kemudian dicuci bersih dan dilanjutkan ke tahap selanjutnya. Akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) diperoleh di Singaraja, Bali.

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.). Determinasi akar bidara ini dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan untuk penelitian. Determinasi harus dicocokkan pula dengan pustaka yang dibuktikan di Laboratorium Universitas Setia Budi.

2. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) dengan cara dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang sudah bersih dipotong-potong kemudian ditimbang, setelah itu dikeringkan dengan cara dioven. Akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) diserbuk dengan alat penyerbuk kemudian diayak dengan menggunakan ayakan nomor 40 sehingga diperoleh serbuk yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)

Penetapan susut pengeringan akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) dilakukan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Serbuk ditimbang sebanyak 2 gram dan suhu *moisture balance* yang digunakan adalah 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan (DepKes RI 2000).

4. Pembuatan ekstrak etanol 70% akar bidara

Serbuk akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) ditimbang sebanyak 1000 gram bagian serbuk kering dimasukkan ke dalam botol coklat diisi dengan 7500 ml pelarut etanol 70% dengan perbandingan 10:75. Selama 5 hari dibiarkan dan ditutup, kemudian diletakkan ditempat yang terlindung dari cahaya matahari sambil berulang-ulang diaduk. diperas ampas kemudian diencerkan. Ampas dibilas dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian (DepKes RI 1986). Persen rendemen diperoleh dari menimbang hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk akar bidara kering dan kalikan 100% (MenKes RI 2009).

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

5. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol akar bidara dilakukan dengan cara esterifikasi etanol, dimana ekstrak ditambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan bila tidak ada bau ester berarti sudah tidak terdapat etanol (Praeparandi 2006).

6. Fraksinasi ekstrak etanol akar bidara

Ekstrak akar bidara sebanyak 10 gram dilarutkan dengan 75 mL air. Dimasukkan dalam corong pisah dan ditambahkan *n*-heksana, diekstraksi cair-cair sebanyak 3x masing-masing 75 mL. Fase *n*-heksana ditampung, dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* suhu 40°C sehingga menjadi fraksi *n*-heksana. Residu dari fraksi *n*-heksana dimasukkan dalam corong pisah. Ditambah etil asetat masing-masing 75 mL sebanyak 3x. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* suhu 40°C, sehingga menjadi fraksi etil asetat. Residu dari fraksi etil asetat dipekatkan dengan waterbath suhu ± 50°C sehingga menjadi fraksi air (DepKes RI 1979).

7. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat pada akar bidara. Pengujian kandungan senyawa alkaloid, fenolik, saponin, dan steroid dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi.

7.1 Identifikasi alkaloid. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram ditambah 1 mL HCl 2N dan 9 mL aquadestilata lalu panaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi 3 bagian, masing-masing ditambah pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendroff. Hasil positif ditunjukkan terbentuk endapan putih, terbentuk warna coklat kemerahan, terbentuk jingga (Setyowati *et al.* 2014).

7.2 Identifikasi fenolik. Ekstrak diukur sebanyak 1 mL direaksikan dengan larutan FeCl₃ 5% sebanyak 2-3 tetes. Hasil positif ditunjukkan terbentuk

warna hitam, ungu kehitaman, hitam abu-abu, coklat kekuningan. (Harborne 1987).

7.3 Identifikasi saponin. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram lalu dilarutkan dalam air panas kemudian dikocok dengan kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan terbentuknya busa yang stabil setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit. Pada penambahan 1 tetes HCl buih tidak hilang (Setyowati *et al.* 2014).

7.4 Identifikasi steroid. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram ditambah dengan pereaksi Liebermann-Burchard 1 mL. Adanya senyawa steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman (Harborne 2006).

8. Sterilisasi

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Cawan petri dan tabung reaksi disterilkan dengan oven pada suhu 170°C-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanas api langsung, dan sterilisasi inkas menggunakan formalin (Suriawiria 2005).

9. Identifikasi bakteri uji *Escherichia coli*

9.1 Identifikasi koloni *Escherichia coli*. Suspensi bakteri uji *Escherichia coli* diinokulasikan pada media selektif *Endo Agar* (EA) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif jika penampakan koloni yang terjadi berwarna merah kilat logam (Kartika *et al.* 2014).

9.2 Identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri tersebut golongan *Escherichia coli*. Gram negatif didapatkan bila sel bakteri berwarna merah, bentuk bacili berarti positif golongan *Escherichia coli*. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian ditetesi Kristal Violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada kedua preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian tetesi mordant (lugol iodine/Gram B), diamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan

dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C (alkohol : aceton 1:1) dan diamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian keringkan preparat. Setelah itu preparat ditetesi Safranin (Gram D) tunggu 45 detik, dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian dikeringkan preparat dengan kertas tissue yang ditempelkan disisi ulasan lalu didiamkan sampai mengering di udara (Volk & Wheeler 1988). Hasil positif untuk Gram negatif ditunjukkan dengan warna sel bakteri merah (Kartika *et al.* 2014).

10. Identifikasi bakteri uji secara biokimia

10.1 Media SIM (*Sulfide Indol Motility*). Biakan murni diinokulasikan pada permukaan media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif apabila media berwarna hitam, uji indol positif apabila terbentuk warna merah setelah ditambah dengan reagen Erlich A dan B, uji motilitas positif apabila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Hasil positif *Escherichia coli* ditunjukkan Sulfide negatif, Indol positif, motility positif (- + +).

10.2 Media KIA (*Kliger's Iron Agar*). merupakan media yang berbentuk padat, keadaan miring, warna merah, dan berfungsi untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) serta sulfida. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan pada bagian lereng dan dasar ada tidaknya gas dan terbentuk warna hitam pada media. Pada bagian miring, jika bakteri dapat memfermentasi laktosa dan glukosa, warna media berubah menjadi kuning (Raihana 2011).

10.3 Media LIA (*Lysin Iron Agar*). merupakan media yang mengandung glukosa, asam amino lisin dan brom kresol ungu sebagai pH indikator, serta natrium trisulfat. Metode ini bertujuan untuk identifikasi mikroba penghasil enzim yang mampu mendekarboksilasi asam amino dan memproduksi gas H₂S. Pengujian ini dilakukan dengan cara inokulasi biakan bakteri secara tusukan dan goresan, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan

dilakukan pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media menunjukkan positif adanya sulfida (Haryani 2012).

10.4. Media sitrat merupakan media yang digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Uji positif apabila media berwarna biru (Jawetz *et al.* 1986).

11. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam biakan murni diambil kurang lebih 2 ose dan dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi 10 mL media BHI (*Brain Heart Infusion*) yang kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan McFarland 0,5. Bakteri *Escherichia coli* dianggap setara dengan 757 juta/mL bakteri, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Suspensi yang didapatkan diencerkan dengan perbandingan 1:1000 (Bonang & Koeswardono 1982).

12. Pengujian aktivitas antibakteri akar bidara secara difusi

Ekstrak etanol 70% fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) yang diperoleh diuji secara difusi dengan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Pengujian daya antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta. Metode yang digunakan yaitu difusi dengan mencelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat kemudian diinokulasikan ke dalam medium MHA (*Mueller Hinton Agar*) sebanyak 30 mL. Larutan stok ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dibuat masing-masing tiga konsentrasi yaitu 50%, 25%, dan 12,5%, dengan menggunakan pelarut DMSO 5%.

Secara aseptis bakteri diratakan pada cawan petri yang telah memadar dengan menggunakan kapas lidi steril. Setelah itu dipipet 30 µl larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air kemudian diteteskan pada kertas cakram yang telah disterilkan dan didiamkan pada suhu kamar selama 10-20 menit. Kertas cakram yang telah dijenuhkan dari semua konsentrasi kemudian diletakkan diatas media, sebagai pembanding diletakkan pula kertas cakram

siprofloksasin dan sebagai kontrol negatif diletakkan pula kertas cakram yang telah ditetesi DMSO 5%. Replikasi dilakukan tiga kali. Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya, setelah itu diukur diameter zona hambat sekitar kertas cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar kertas cakram menandakan bahwa kandungan kimia akar bidara memiliki daya hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

13. Pengujian antibakteri akar bidara secara dilusi

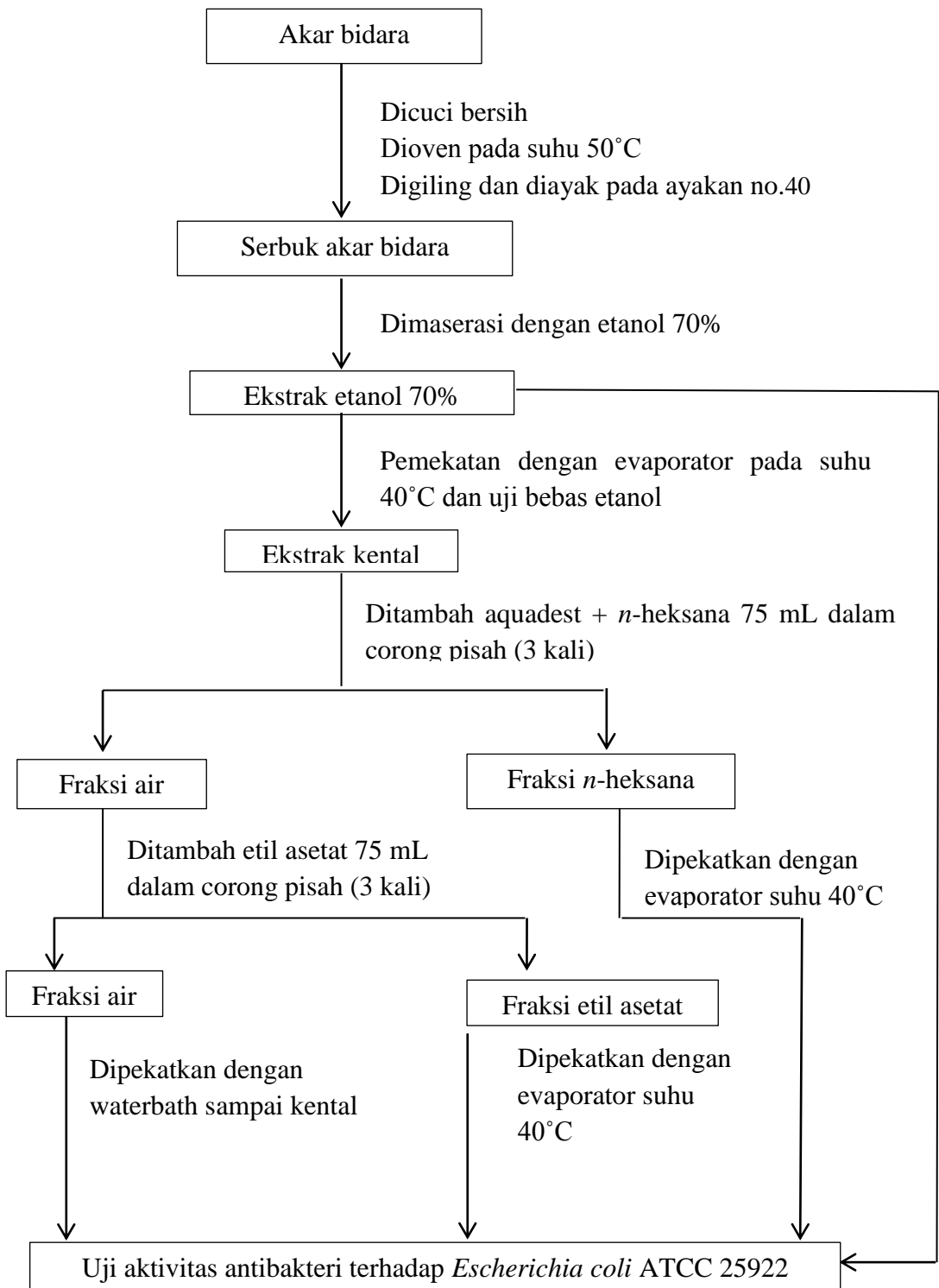
Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah suatu sediaan yang dapat membunuh bakteri uji. Metode ini menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 12 tabung steril. tabung tersebut masing-masing mempunyai konsentrasi yang berbeda-beda yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,80%, 0,40%, 0,20%, 0,1%, ditambah kontrol positif dan kontrol negatif. Medium BHI dimasukkan 0,5 mL ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptis, tabung kedua dan ketiga ditambahkan 0,5 mL fraksi teraktif, dari tabung ketiga diambil 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung keempat dan begitu seterusnya sampai tabung kesebelas, terakhir diambil 0,5 mL lalu dibuang.

Suspensi bakteri dalam medium *Brain Heart Infusion* (BHI) dimasukkan ke dalam tabung uji sebanyak 0,5 mL. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam, lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif untuk masing-masing bakteri uji. Bakteri yang sudah digoreskan pada media selektif diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 24-48 jam. Mengamati ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media *Endo Agar* yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

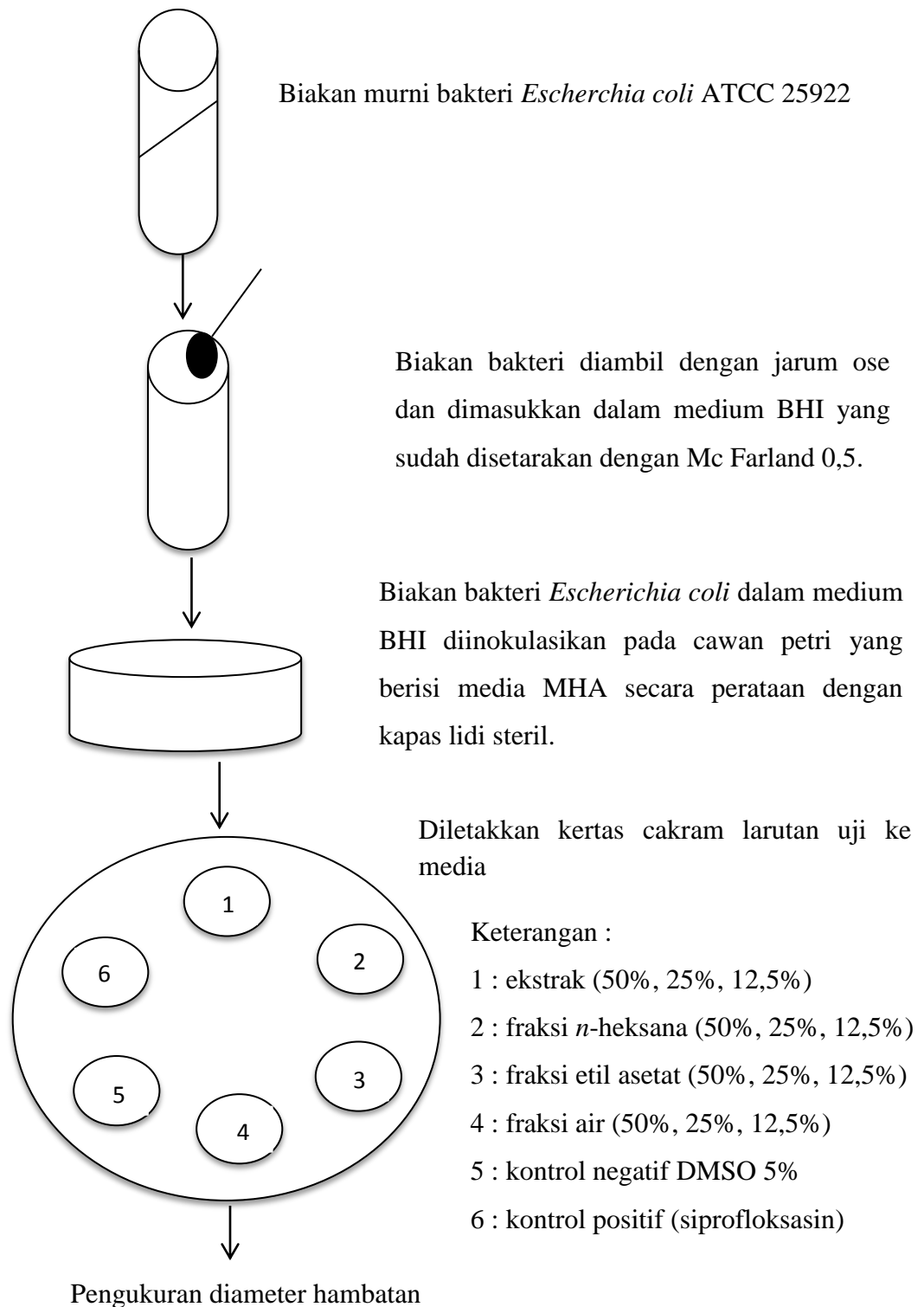
E. Analisis Data

Data aktivitas antibakteri antar fraksi ekstrak etanol 70% akar bidara diuji secara statistik dengan Analisis of Varian (ANOVA) dengan menggunakan *software* SPSS 18 pada konsentrasi yang sama untuk data hasil uji difusi. Metode

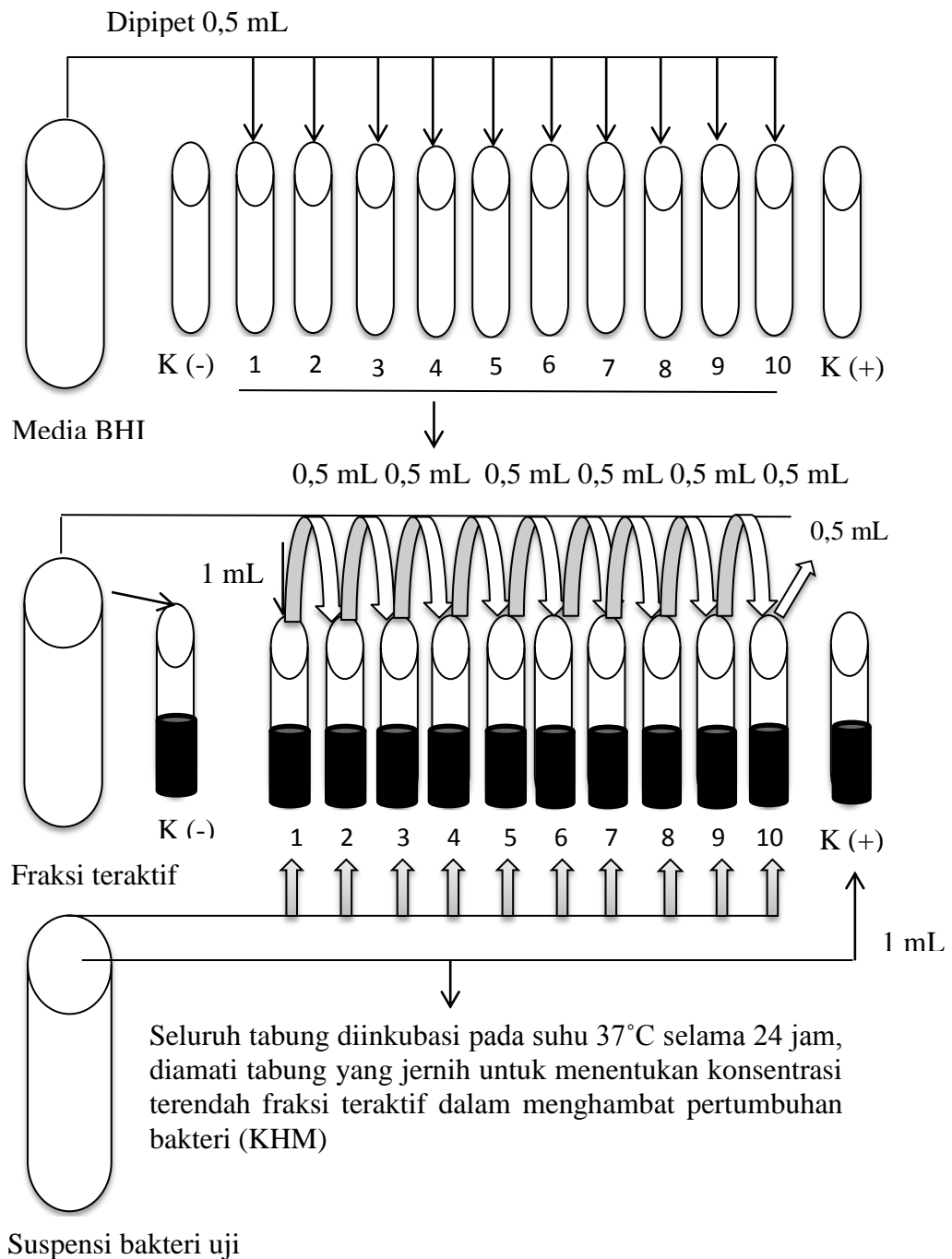
analisis yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji distribusi normal (*Kolmogorov-Smirnov*), jika tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan metode uji non parametrik, sedangkan jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA).



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara



Gambar 2. Skema uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara difusi.



Tabung yang jernih diinokulasikan pada media *Endo Agar*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diamati ada tidaknya koloni bakteri untuk menentukan konsentrasi terendah fraksi teraktif dalam membunuh pertumbuhan bakteri (KBM).

Gambar 3. Skema uji aktivitas fraksi teraktif ekstrak akar bidara terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara dilusi.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Hasil determinasi akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)

Identifikasi tanaman pada penelitian ini bertujuan untuk mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman yang akan diteliti, mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Identifikasi tanaman akar bidara dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistemika Tumbuhan, Universitas Setia Budi, Surakarta.

Berdasarkan hasil identifikasi yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar tanaman akar bidara. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Hasil pembuatan serbuk akar bidara

2.1 Pengumpulan bahan. Akar bidara diambil pada bulan Januari tahun 2018 secara acak dengan memilih akar yang segar dan tidak busuk dan diperoleh di Singaraja, Bali.

2.2 Pengeringan akar bidara. Akar bidara dicuci bersih dengan air mengalir dan dipotong-potong. Dijemur di bawah sinar matahari secara tidak langsung setelah itu dimasukkan dalam oven pada suhu 45°C 5-7 hari. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terkandung dalam tanaman. Pengeringan dapat mencegah terjadinya kerusakan simplisia oleh kapang, bakteri dan mikroorganisme lainnya. Akar bidara yang sudah kering kemudian dilakukan proses perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah akar bidara dapat dilihat pada tabel 1. Hasil perhitungan bobot kering terhadap bobot basah pada lampiran 11 .

Tabel. 1 Persentase bobot kering terhadap bobot basah akar bidara

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
6000	4000	66,67

Hasil dari bobot basah akar bidara 6 kg diperoleh bobot kering serbuk akar bidara 4 kg diperoleh prosentase bobot kering terhadap bobot basah sebesar 66,67% b/b. Prosentase rendemen rendah dari bobot basah akar bidara menjadi bobot kering akar bidara disebabkan kandungan air pada akar bidara tinggi.

3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk akar bidara

Penetapan susut pengeringan serbuk akar bidara dapat dihitung berdasarkan dengan penggunaan alat *moisture balance*. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk akar bidara dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk akar bidara

No	Bobot awal (gram)	Bobot akhir (gram)	Susut kering (%)
1	2,00	1,88	8,0
2	2,00	1,86	7,8
3	2,00	1,86	7,8
Rata- rata			7,86

Berdasarkan tabel 2 penetapan susut pengeringan yaitu dilakukan 3 kali replikasi dengan alat *moisture balance*. Rata-rata persentase susut pengeringan serbuk akar bidara 7,86 %. Pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan yang dinyatakan sebagai nilai persen (DepKes RI 2000).

4. Hasil pembuatan ekstrak etanol akar bidara

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi akar bidara adalah etanol 70%. Metode yang digunakan dalam ekstraksi ini adalah maserasi. Maserasi menggunakan etanol 70%, karena etanol 70% lebih bersifat polar dibandingkan pelarut etanol 96% atau etanol 95%. Ekstrak cair yang diperoleh dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator*. Hasil pembuatan ekstrak akar bidara dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Pembuatan ekstrak akar bidara

Serbuk akar bidara (gram)	Ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
1000	236	23,6

hasil dari maserasi akar bidara didapatkan ekstrak kental sebanyak 236 gram. Presentase rendemen ekstrak maserasi akar bidara diperoleh sebesar 23,6%. Ekstrak tersebut kemudian dilakukan fraksinasi dengan *n*-heksana, etil asetat dan air. Rendemen adalah perbandingan jumlah yang dihasilkan dari ekstraksi

tanaman. Hasil perhitungan rendemen ekstrak etanol akar bidara dapat dilihat pada lampiran 12.

5. Hasil uji bebas etanol akar bidara

Ekstrak akar bidara dilakukan uji bebas etanol. Uji bebas etanol menggunakan reagent asam sulfat dan asam asetat. Hasil uji bebas etanol dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Uji bebas etanol ekstrak akar bidara

Esterifikasi	Bahan uji	Hasil	Pustaka
Ekstrak + CH ₃ COOH + H ₂ SO ₄ pekat, dipanaskan	Ekstrak akar bidara	Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol	Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol (DepKes 1986).

Hasil uji bebas etanol pada tabel 4 menunjukkan bahwa ekstrak akar bidara tersebut sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 70% yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol. Uji bebas etanol membuktikan bahwa masing-masing ekstrak tersebut sudah tidak ada mengandung etanol yang memiliki aktivitas antibakteri, sehingga tidak mengganggu aktivitas dari masing-masing ekstrak.

6. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi akar bidara

Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi akar bidara yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi akar bidara mengandung senyawa kimia alkaloid, fenolik, saponin dan steroid. Hasil identifikasi ekstrak dan fraksi akar bidara dapat dilihat pada tabel 5. Foto hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 5. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia seekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air

Senyawa	Pustaka	Interpretasi hasil			
		Ekstrak	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
Alkaloid	Positif ditandai dengan penambahan dragendrof terbentuk endapan warna coklat, kuning, hingga jingga (Harborne 1987)	+	+	-	-
Fenolik	Positif jika timbul warna hitam setelah penyemprotan pereaksi FeCl ₃ 10% (Marliana 2007).	+	+	+	-
Saponin	Positif jika membentuk bercak warna hijau sampai biru setelah penyemprotan anisaldehyd-asam sulfat (Harborne 1987).	+	-	+	+
Steroid	Positif jika terbentuk warna biru setelah penyemprotan menggunakan Liebermann Burchard (Harborne 2006)	+	+	-	-

Keterangan :

- + : mengandung golongan senyawa
- : tidak mengandung golongan senyawa

Tabel diatas menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa alkaloid, fenolik, saponin, dan steroid, fraksi *n*-heksana mengandung senyawa steroid, alkaloid, dan fenolik. lalu pada fraksi etil asetat mengandung fenolik dan saponin, sedangkan fraksi air mengandung senyawa saponin.

7. Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

7.1 Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* secara makroskopis.

Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 diinokulasikan pada media *Endo Agar* (EA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan koloni yang dihasilkan berwarna merah dengan kilat logam yang permanen. Warna koloni merah disebabkan karena bakteri *Escherichia coli* dan koliform memetabolisme laktosa menjadi aldehid dan asam, sehingga aldehid bereaksi dengan fuchsin. Aldehid akan melepaskan fuchsin dari senyawa fuchsin-sulfat kemudian akan

mewarnai koloni menjadi merah dan akan terlihat berwarna seperti kilatan logam (Kartika *et al.* 2014). Gambar hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* secara makroskopis dapat dilihat pada lampiran 7.

7.2 Hasil identifikasi mikroskopis bakteri *Escherichia coli* dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri tersebut golongan Gram negatif. Gram negatif didapatkan bila sel bakteri berwarna merah, bentuk bacili berarti positif golongan *Escherichia coli*. Pewarnaan Gram dilakukan dengan membuat preparat ulasan (smear) yang difiksasi kemudian ditetesi violet (Gram A). Kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri. Penetesan *Lugol's iodine* (Gram B) akan menyebabkan adanya ikatan kristal violet dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas pengikatan warna oleh bakteri. Penetesan Gram C (alkohol) menyebabkan pori-pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks kristal violet tidak menempel di dinding sel, menyebabkan Gram negatif menjadi bening. Penetesan safranin (Gram D) akan mewarnai sel Gram negatif menjadi warna merah (Volk dan Wheller 1988). Gambar hasil identifikasi mikroskopis dapat dilihat dalam lampiran 7.

7.3 Hasil identifikasi biokimia bakteri *Escherichia coli*. Bakteri ditanam dalam media SIM, KIA, LIA, SITRAT diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji biokimia berdasarkan tabel 6 dan gambar hasil identifikasi biokimia dapat dilihat pada lampiran 7.

Tabel 6 : Hasil identifikasi biokimia bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Pengujian	Hasil	Pustaka	Interpretasi data
SIM	- + +	- + +	+
KIA	A/AGS (-)	A/AGS (-)	+
LIA	K/KS (-)	K/KS (-)	+
SITRAT	-	-	+

Keterangan :

SIM	: Sulfida Indol Motility	A	: Acid (kuning)
KIA	: Klinger's Iron Agar	K	: Alkali (merah atau ungu)
LIA	: Lysin Iron Agar	S	: Sulfida (hitam)
(+)	: Reaksi Positif	G	: Gas
(-)	: Reaksi Negatif		

Hasil uji pada media *Sulfida Indol Motility* (SIM) untuk mengetahui terbentuknya sulfide, indol, dan motilitas. Pengujian bakteri *Escherichia coli* pada media *Sulfida Indol Motility* (SIM), setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil -++. Pada uji sulfida *Escherichia coli* tidak dapat mereduksi thiosulfate sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam pada media. Uji indol dilakukan dengan menambahkan tiga tetes Erlich A dan Erlich B menunjukkan hasil + dengan terbentuknya warna merah muda pada permukaan yang artinya bakteri *Escherichia coli* membentuk indol dari tryptopan sebagai sumber karbon. Tryptopan adalah suatu asam amino esensial yang dapat mengalami reaksi oksidasi dengan cara enzimatis bakteri. Uji motilitas positif ditunjukkan dengan adanya penyebaran berwarna putih seperti akar disekitar inokulasi pada media *Sulfida Indol Motility* (SIM), hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri memiliki flagel.

Hasil pengujian pada medium *Klinger's Iron Agar* (KIA) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada atau tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Hasil yang didapatkan yaitu A/AGS(-), A/A artinya pada lereng dan dasar media berwarna kuning, hal ini menunjukkan bahwa *Escherichia coli* mampu memfermentasi glukosa dan laktosa. Medium *Klinger's Iron Agar* (KIA) mengandung laktosa 1%, glukosa 0,1%, dan *Phenol red* (dalam suasana asam). *Klinger's Iron Agar* (KIA) juga mengandung sodium thiosulfate yaitu suatu substrat yang menghasilkan H₂S. G artinya terdapat gas sehingga menyebabkan media terangkat, S (-) artinya uji hydrogen sulfide negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media *Klinger's Iron Agar*, endapan hitam ini terbentuk dari hydrogen sulfida yang akan bereaksi dengan Fe⁺⁺. Hydrogen sulfida terbentuk karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan methion (Sri 2016).

Hasil pengujian pada medium *Lysine Iron Agar* (LIA) untuk mengetahui suatu reaksi kimiawi pada metabolisme yang melepaskan gugus amina dari molekul asam amino (deaminasi) dan reaksi kimia yang menyebabkan sebuah gugus karboksil terlepas dari senyawa semula menjadi karbon dioksida

(dekarboksilasi) lisin dan sulfida. Pengujian dengan LIA menunjukkan hasil K/KS (-), K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi media, S (-) artinya Uji H₂S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA (Sri 2016).

Hasil pada medium *Sitrat* untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan *Sitrat* sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian *Sitrat* menunjukkan hasil negatif karena warna media tidak berubah atau tetap hijau, menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal hal ini menunjukkan bahwa *Escherichia coli* tidak menggunakan *Sitrat* sebagai sumber karbon tunggal. Pengamatan yang dilakukan menunjukkan hasil bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada lampiran 13.

Berdasarkan dari hasil pengujian identifikasi yang telah dilakukan kemudian dibandingkan dengan pustaka menunjukkan bahwa bakteri yang diamati adalah *Escherichia coli* ATCC 25922.

8. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri uji diambil dari biakan murni pada media *Nutrient Agar* (NA) diambil kurang lebih 2 ose dan dimasukkan tabung yang telah diisi 10 mL media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang kekeruhannya disesuaikan dengan Mc Farland 0,5. Tujuan disesuaikan dengan Mc Farland 0,5 yaitu untuk mengetahui kisaran jumlah koloni bakteri yang terdapat pada suspensi.

9. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi dari akar bidara dengan metode difusi

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi yaitu untuk mengetahui zona hambat pertumbuhan dari bakteri uji. Pengujian antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menggunakan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari akar bidara. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5%. Pelarut DMSO% merupakan pelarut yang digunakan dalam pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air. Pelarut DMSO 5% merupakan pelarut organik dan tidak

bersifat bakterisidal (Reynolds 1996), untuk itu DMSO 5% perlu diikuti sertakan dalam pengujian aktivitas antibakteri.

Antibiotik siprofloksasin sebagai kontrol positif. Mekanisme kerja ciprofloksasin menghambat sintesis asam nukleat. Antibiotik golongan ini dapat masuk ke dalam sel dengan cara difusi pasif. Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi akar bidara terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dilakukan dengan waktu inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Daya antibakteri dari setiap ekstrak dan fraksi dapat dilihat dari ada tidaknya zona hambat disekitar disk cakram, yang ditandai adanya daerah jernih yang diukur dalam satuan milimeter (mm). Hasil uji dibandingkan dengan kontrol positif yaitu antibiotik siprofloksasin. Hasil uji aktivitas antibakteri metode difusi dapat dilihat pada tabel 7. Gambar hasil metode difusi dapat dilihat pada lampiran 9.

Tabel 7. Hasil uji aktivitas antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi

Sediaan uji	Konsentrasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata (mm)
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	50%	15	13	14	14,3
	25%	13	12	11	11,6
	12,5%	10	10	12	10,6
Fraksi <i>n</i> -heksana	50%	8	7	8	7
	25%	7	6	6	7
	12,5%	6	6	7	7
Fraksi etil asetat	50%	17	16	18	17
	25%	15	16	15	15,3
	12,5%	13	13	12	12,6
Fraksi air	50%	17	15	17	16
	25%	8	8	9	8,6
	12,5%	6	7	7	7
Kontrol (+)	5%	32	33	32	32,33
Kontrol (-)	5%	0	0	0	0

Keterangan :

Kontrol (+) : Siprofloksasin

Kontrol (-) : DMSO 5%

Diameter hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 ditunjukkan dengan terbentuknya daerah jernih di sekeliling cakram (disk).

Aktivitas antibakteri suatu senyawa dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain kandungan senyawa antibakteri, daya difusi ekstrak, jenis bakteri yang dihambat dan konsentrasi ekstrak (Jawetz et al., 1996). Konsentrasi ekstrak yang semakin tinggi menyebabkan terbentuknya zona hambat bening atau zona hambatan yang semakin besar. Semakin pekat konsentrasi suatu ekstrak, maka senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak tersebut semakin banyak. Semakin tinggi konsentrasi suatu ekstrak, maka akan semakin besar efek yang ditimbulkannya (Peleczar dan Chan. 2005).

Hasil uji pada tabel 7 menunjukkan bahwa kontrol positif dan keempat pelarut diatas telah memberikan aktivitas yang menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* untuk kontrol negatif, menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kontrol positif dan jenis pelarut dalam berbagai konsentrasi. Kontrol negatif menunjukkan tidak adanya zona hambat. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol negatif yang digunakan tidak berpengaruh pada uji antibakteri. Kontrol positif menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji dibandingkan dengan kontrol negatif.

Rata-rata diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 untuk konsentrasi fraksi etil asetat 50% (17 mm); 25% (15,3 mm); 12,5% (12,6%), menunjukkan perbedaan nyata terhadap konsentrasi 50%; 25%; 12,5% pada fraksi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, dan fraksi air. Hal ini berarti konsentrasi etil asetat tersebut menunjukkan efek berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Efek antibakteri yang paling aktif dapat dilihat pada konsentrasi 50%. Konsentrasi terkecil yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji terdapat pada konsentrasi 12,5%, untuk memastikan fraksi etil asetat benar teraktif maka dilakukan uji analisis data.

Analisis data yang diperoleh dari hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi secara statistik *One Way* (ANOVA). *One Way* (ANOVA) bertujuan membandingkan sampel pada setiap konsentrasi dan membandingkan hubungan antara ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, kontrol positif dan kontrol negatif untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan. Uji One-Sample Kolmogorov-Smirnov bertujuan mengetahui data yang diperoleh

terdistribusi normal atau tidak, jika data yang diperoleh terdistribusi normal maka akan dilakukan uji *One Way* (ANOVA). Hasil uji *One Way* ANOVA pada tabel diameter hambat memiliki perbedaan nyata dalam menghambat *Escherichia coli* ATCC 25922. Tabel uji Tukey terdapat tanda * pada *Mean Difference* menunjukkan bahwa perbedaan diameter hambat pada aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* terdapat 7 subsets, semakin kekanan arahnya semakin besar diameter hambatnya. Diameter hambat diketahui dari subsets 1-7 mempunyai perbedaan nyata dalam menghambat aktivitas antibakteri. Fraksi teraktif yang didapat adalah etil asetat. Subests 6 menunjukkan 3 sampel yang memiliki diameter hambat hampir sama, yaitu fraksi air 50% (15,3 mm), fraksi etil asetat 25% (16,3 mm) dan fraksi etil asetat 50% (17 mm). Semua sampel yang didapat pada subsets 6 dapat dilanjutkan pada uji dilusi, tetapi pada penelitian ini hanya menggunakan fraksi teraktif. Fraksi teraktif yang dilihat pada subsets 6 yaitu fraksi etil asetat, dilanjutkan pada uji dilusi. Hasil analisis Tukey dan tabel *Homogenous subsets* dapat dilihat pada lampiran 16.

10. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi

Sediaan uji yang digunakan dalam metode ini adalah fraksi teraktif dari akar bidara dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang diperoleh dari metode difusi. Metode dilusi berguna untuk mencari KHM dan KBM menggunakan sediaan fraksi teraktif yaitu fraksi etil asetat dari akar bidara. Seri konsentrasi yang digunakan yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,57%, 0,79%, 0,40%, 0,20%, 0,10%, kontrol (+), dan kontrol (-). Antibiotik siprofloksasin digunakan sebagai pembanding dalam metode dilusi. Kadar terendah larutan uji yang terlihat jernih dapat ditentukan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), tetapi hal ini sulit diamati karna warna dari larutan uji tersebut menutupi kejernihan pada tabung. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dapat ditentukan dengan cara masing-masing tabung lautan uji dilakukan penggoresan pada media *Endo Agar*, setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil uji aktivitas

antibakteri dengan metode dilusi dapat dilihat pada tabel 8. Foto hasil uji dilusi fraksi etil asetat dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 8. Hasil uji dilusi fraksi etil asetat dan antibiotik siprofloksasin

No	Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat		
		Replikasi		
		I	II	III
1	50	-	-	-
2	25	-	-	-
3	12,5	-	-	-
4	6,25	-	-	-
5	3,13	+	+	+
6	1,57	+	+	+
7	0,79	+	+	+
8	0,40	+	+	+
9	0,20	+	+	+
10	0,10	+	+	+
11	Kontrol (+)	+	+	+
12	Kontrol (-)	-	-	-

Keterangan :

(+) = terdapat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

(-) = tidak terdapat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Hasil yang didapatkan dari uji aktivitas antibakteri yang telah dilakukan diketahui bahwa fraksi etil asetat pada konsentrasi 6,25% mampu membunuh *Escherichia coli* ATCC 25922, mekanisme fenolik sebagai antibakteri yang terkandung dalam etil asetat memiliki aktivitas antibakteri karena mampu mendenaturasi protein dan mengganggu fungsi membran sel sebagai lapisan yang selektif sehingga sel menjadi lisis (Jawetz *et al.* 1995). Siprofloksasin mampu menghambat sintesis asam nukleat dimana antibiotik golongan ini dapat masuk ke dalam sel dengan cara difusi pasif melalui kanal protein terisi air (porins) pada membran luar bakteri secara intra seluler, secara unik obat-obat ini menghambat replikasi DNA bakteri dengan cara mengganggu kerja DNA gyrase (topoisomerase II) selama pertumbuhan dan reproduksi bakteri (Mycek 2001).

Perbandingan fraksi etil asetat sebagai fraksi teraktif dengan Siprofloksasin sebagai antibakteri menunjukkan hasil jauh dari yang diharapkan karena antibiotik Siprofloksasin memiliki daya antibakteri yang lebih aktif jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat yang telah diuji, maka harus dilakukan penelitian lebih lanjut tentang akar bidara.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, fraksi yang paling aktif dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah fraksi etil asetat 50% dengan diameter sebesar 50% mm

Ketiga, fraksi etil asetat dari akar bidara (*Zizyphus mauritiana* lamk.) memiliki Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 sebesar 6,25%

B. Saran

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

Kedua, perlu dilakukan uji antibakteri dari akar bidara menggunakan pelarut yang lebih efektif.

Ketiga, perlu dilakukan penelitian lebih dengan pembanding antibiotik yang sesuai dengan mekanisme senyawa-senyawa yang terkandung di dalam akar bidara (*Zizyphus mauritiana* Lamk.)

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurahman D. 2008. *Biologi Kelompok Pertanian dan Kesehatan*. Bandung: Grafindo Media Pratama.
- Alamsyah, Kurniawan H. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut (J.G.agardh) dari perairan pulau pajang Jepara terhadap bakteri *Escherichia Coli* dan *Staphylococcus epidermis*. *Jurnal Of Marine Research* 3:60-78
- Ansel CH. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Farida Ibrahim, Penerjemah; Edisi ke-4. Jakarta: Universitas Indonesia
- Antika W, Gustina I, Irdawati. 2014. Uji daya hambat ekstrak daun bunga tanjung (*Mimuspos elengi L.*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* [Skripsi]. Padang: Program Studi Pendidikan Biologi Sekolah Tinggi Keguruan dan Ilmu Pendidikan (STKIP) PGRI
- Arief Hariana. 2006. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Bele YM, Focho DA, Egbe EA, Chuyong BG. 2011. Ethnobotanical survey of the uses the members of Annonaceace around Mount Cameroon. *African Journal Plant Science*. 5(3): 1-13
- Bonang G dan Koeswardono. 1982. *Mikrobiologi Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Burton GRW, Engelkirk PG. 2004. *Microbiology for the health sciences*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Cahyono R. 2013. *Uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak bunga biduri (Calotropis gigantean (L.) Dryand) terhadap Escherichia coli ATCC 25922 secara in vitro* [Skripsi]. Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
- Carter GR, Wise DJ. 2004. *Essential of Veterinary Bacteriology and Mycology*. 6th Ed. Iowa: *Blackwell Publishing*.
- Darmadi. 2008. *Infeksi Nosokomial : Problematika Dan Pengendaliannya*. Jakarta: *Penerbit Salemba Medika*.
- David G, Watson. 2009. *Analisis Farmasi*. Edisi 2. Jakarta: *Penerbit Buku Kedokteran EGC*
- Denyer, S. T., Hodges, N. A., & Gorman, S. P., 2004. *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology, Seventh Edition*, *Blackwell Publishing Company*, UK.
- [DepKes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. *Materia Medika Indonesia*. Jilid III. Jakarta: DepKes RI

- [DepKes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: DepKes RI
- [DepKes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: DepKes RI.
- [DepKes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2007. *Riset Kesehatan Dasar*. Edisi III Jakarta: DepKes RI.
- [DepKes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta : DepKes RI.
- Gaur A, Sharma GN. 2013. *Ziziphus mauritiana* Lam-an Overview. *Indo American Journal of Pharm Research*. 3(6): 4560-4566.
- Ganiswara. 2005. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Jakarta: Gaya Baru.
- Goyal M, Nagori BP, Sasmal D. 2012. Review on ethnomedicinal uses, pharmacological activity and phytochemical constituents of *Ziziphus mauritiana* (*Z. jujuba* Lam., non Mill). *Spatula DD* 2: 107-116.
- Gunawan D, Mulyani S, 2004. *Ilmu Obat Alam (farmakognosi)*. Jilid 1. 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 Methodh*.
- Harborne JB. 1997. *Metode Fitokimia: Penuntun dan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Methodh*.
- Harborne JB, 2006. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Edisi III. Penerbit ITB. Bandung.
- Hardjoeno UL. 2007. *Kapita selekta hepatitis virus dan interpretasi hasil laboratorium*. Makassar: Cahya Dinan Rucitra.
- Haryani Y, Chainulfiffah, Rustiana, 2012. Fermentasi Karbohidrat Oleh Isolate *Salmonella* spp. Dari Jajanan Pinggir Jalan. *Jurnal Indonesia* 3: 23-25
- Heyne K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid 3*. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Edisi XVI. Dokter Bonang H, Penerjemah; Jakarta: Fakultas Kedokteran Unika Atmajaya.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1995. *Review of Medical Microbiology*. Los Altos. California: Lange Medical Publication..
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika

- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran, 23thEd.* Hartanto H, penerjemah; Jakarta: EGC. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*.
- Jawetz, Melnick, & Adelberg. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerjemah: aryandhito Widhi Nugroho, dkk. Ed. 25 Jakarta: EGC.
- Kartika RAD, Yvonne MI, Trini S. 2014. Analisis Mikrobiologi *Escherichia coli* Pad Hasil Olahan Hewan Sapi Dalam Proses Produksinya, Mkara Kesehatan 9 (1) : 23-28.
- Kristijono A. 2008. Obat Tradisional dan Fitofarmaka. Kediri: *Institut Kesehatan Bhakti Wijaya*
- Kusumaningsih A. 2010. *Beberapa Bakteri Patogenik Penyebab Foodborne Disease Pada Bahan Pangan Asal Ternak*. Wartazoa 20: 103-111
- Madduluri S, Rao K.B, Sitaram B. 2013. In Vitro Evaluation Of Antibacterial Activity Of Five Indigenous Plants Extract Against Five Bacterial Pathogen Of Human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4: 679-684
- Maharani ETW, Mukaromah AH, Farab M.F. 2014. Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sukun kering (*Artocarpus altilis*). *Jurnal Unimus*.
- Maksum R. 2002. *Buku Ajar Mikrobiologi*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. hlm: 125-129
- Marliana E. 2007. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dari Batang *Spatholobus ferrugineus* (Zoll & Moritzi) Benth Yang Berfungsi Sebagai Antioksidan. *Jurnal Penelitisan MIPA* 1:1.
- Mycek MJ, Harvey RA, dan Champe CC. 2001. *Farmakologi Ulasan Bergambar*. Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology. Penerjemah Azwar Agoes. Edisi II. Jakarta. Widya Medika.
- [KEMENKES RI] Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia. 2009. *Suplemen II Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi Pertama. Jakarta : KEMENKES RI
- Muhlisah F. 2005. *Tanaman Obat Keluarga*. Jakarta: Penerbit Swadaya.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*. 7:361-367.
- Praeparandi. 2006. *Card System Analisa Kimia Farmasi Kultatif*. Bandung : Seksi Diktat Stenhl: 9
- Prasetyo, A. D., dan Sasongko, H. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70 % Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Shigella dysenteriae* sebagai Materi Pembelajaran Biologi SMA Kelas X untuk Mencapai Kd 3.4 pada Kurikulum 2013.

- Pratiwi, ST. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Yogyakarta: Penerbit Erlangga. Hlm 116, 188-191
- Prescott LM, Sherwood L, Woolverton CJ. 2008. *Microbiology* 7th edition. USA: McGraw-Hill Book Company.
- Priyanto A, Lestari S. 2009. *Endoskopi Gastrointestinal*. Jakarta: Salemba Medika
- Purnawijayanti, Hiasinta A. 2001. *Sanitasi, Hygiene dan Keselamatan Kerja dalam Pengolahan Makanan*. Kanisius. Yogyakarta
- Radji M. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta: EGC
- Radji M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta: EGC
- Rahayu P, Winiati. 2000. *Aktivitas Antimikroba Bumbu Masakan Tradisional Hasil Olahan Industri Terhadap Bakteri Patogen dan Perusak*. Vol 11(2). Buletin Teknologi dan Industri Pangan
- Raihana N. 2011. *Profil Kultur Dan Uji Sensitivitas Bakteri Aerob Dari Infeksi Luka Operasi Liparotomi Di Bangsal Bedah RSUP dr. Djamil Padang* [Artikel]. Padang : Universitas Andalas Padang.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Setyowati WA, Sri RDA, Ashadi, Bakti Mulyani, Cici PR. 2014. *Skirining Fitokimia Dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Kayu Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Varietas petruk. Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan VI*. ISBN : 9779373174-0 : 271-280
- Steenis CGGJV, Bloembergen, GDHS, Eyma PJ. 2005. *Flora, Cetakan ke-10*. Jakarta: PT. Pradnya Paramita, Jakarta.
- Suraatmaja S. 2007. *Kapita Selekta Gastroenterologi Anak*. 1-5. 11-12. Jakarta: Sagung Seto Steenis V. 2005. *Flora untuk Sekolah di Indonesia*. Jakarta: PT. Pradnya Paramita.
- Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta : Gramedia.
- Syamsuni HA. 2007. *Ilmu Resep*. Elviana E, Syarief RW, Editor. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.
- Tiwari p., Kumar B., Kaur M., Kaur G., Kaur H., 2011. *Phytochemical screening and extraction*. *International Pharmaceutical Sciencia* 1:98-106.
- Upadhyay S, Upadhyay P, Ghosh AK, Singh V. 2012. *Ziziphus mauritiana : A Review on Pharmacological Potential of This Underutilized Plant*. *International Journal of Current Research and Review*
- Upadhyay S, Mishra A, Srivastava S, Upadhyay P, Ghosh AK, Singh V. 2015. *Drug Development and Therapeutics. Antibacterial potency of Ziziphus*

mauritiana (Fam- *Rhamnaceae*) roots Vol. 6 :44-46. [Artikel].
www.ddtjournal.org [12 juli 2017]

Voigt R. 1994. *Buku Pengantar Teknologi Farmasi*, 572-574, diterjemahkan oleh Soedani, N., Edisi V, Yogyakarta, Universitas Gadjah Mada Press.

Volk WA, dan Wheeler MF. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta : Erlangga.

Wijayakusuma Prof.H.M, Hembing. 2000. *Ensiklopedia Milenium Tumbuhan Berkhasiat Obat Indonesia*. Jakarta: PT. Prestasi Insan Indonesia.

Zuhud E, Rahayu WP, Wijaya CH, Sari PP. 2001. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kedawang (*Parkia roxburghli* G. Don) terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 12: Hlm 6-12

L

A

M

P

7

R

A

N

Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman



No : 212/DET/UPT-LAB/31/IV/2018
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Ayu Rodia Ulfa
NIM : 20144197 A
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

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

Hasil determinasi berdasarkan : Steenis : FLORA

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

Deskripsi :

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

Surakarta, 30 April 2018
Timdeterminasi

Dra. Kartinah Wijosoendjojo, SU

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

Akar



Serbuk



Lampiran 3. Gambar alat yang digunakan

Penggilingan



Oven



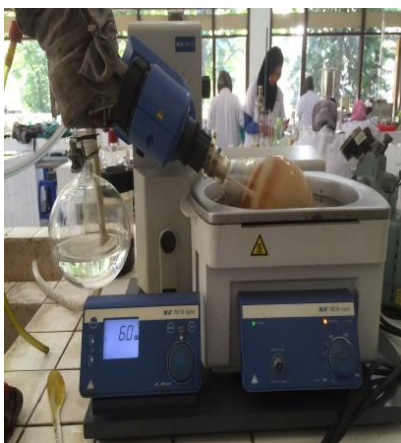
Botol maserasi



Chamber



Evaporator



Ayakan



Moisture Balance



Inkubator



Lampiran 4. Hasil tes bebas etanol



Lampiran 5. Gambar ekstrak etanol dan fraksinasi

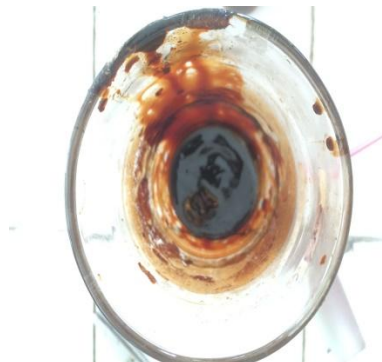
Ekstrak etanol



Fraksinasi

Fraksi *n*-heksana


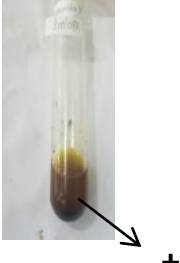

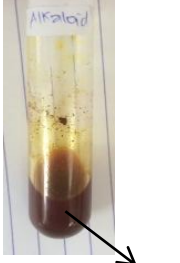





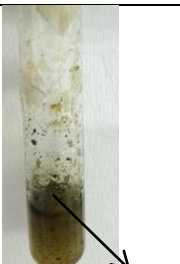
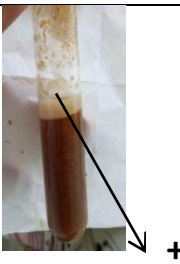
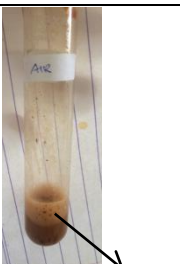




fraksi etil asetat



Fraksi air



Lampiran 6. Gambar identifikasi kandungan senyawa kimia pada ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari akar bidara

	Fraksi			
Senyawa	Ekstrak	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
Alkaloid	 +	 +	 -	 -
Fenolik	 +	 +	 +	 -
Saponin	 +	 -	 +	 +
Steroid	 +	 +	 -	 -

Keterangan :

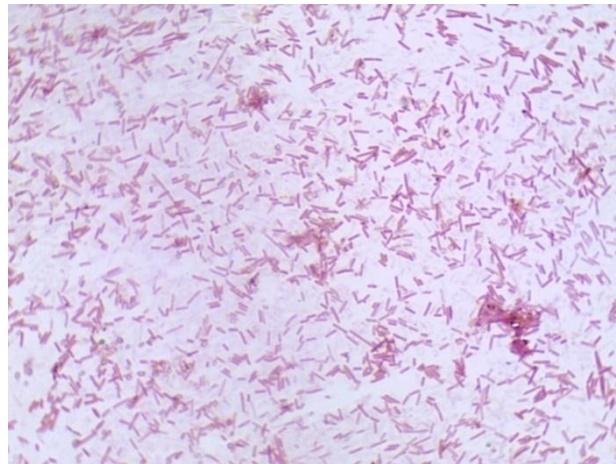
- + : mengandung golongan senyawa
- : tidak mengandung golongan senyawa

Lampiran 7. Hasil identifikasi bakteri uji

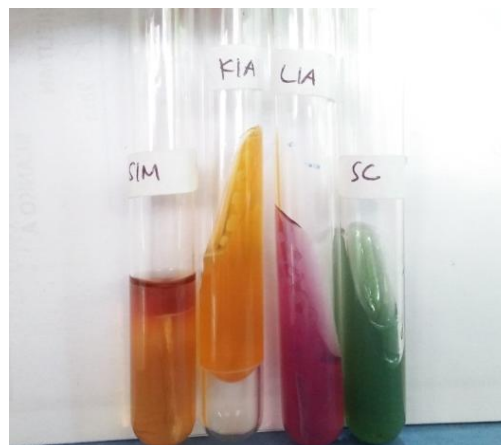
Makroskopis

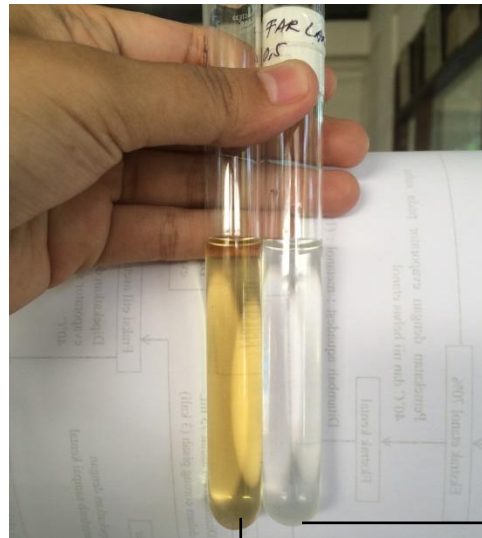


Mikroskopis



Biokimia



Lampiran 8. Hasil pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

→ **Mc. Farland 0,5**

↓
Suspensi bakteri

Lampiran 9. Gambar larutan stock dan hasil uji difusi**Larutan stok ekstrak**

↓ ↓ ↓
50% 25% 12,5%

stok fraksi air

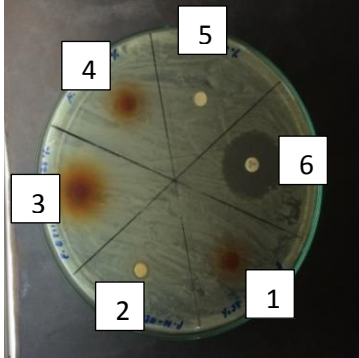
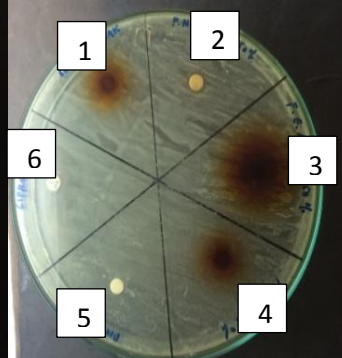
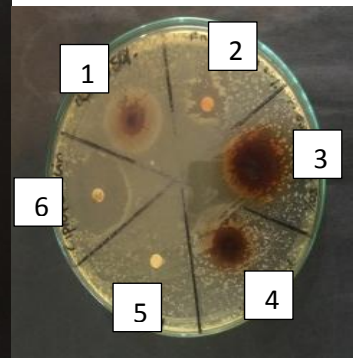
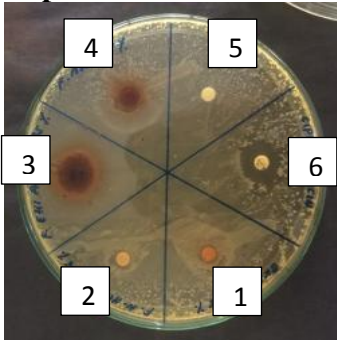
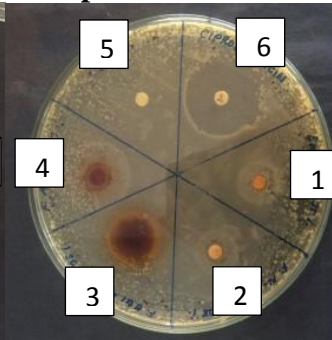
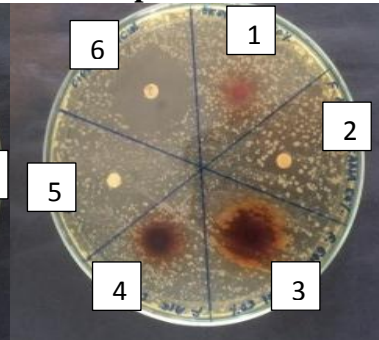
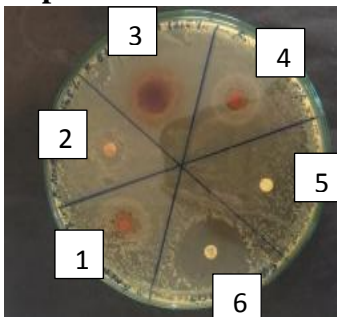
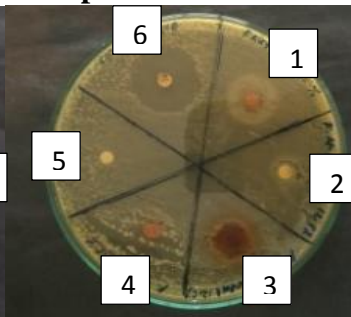
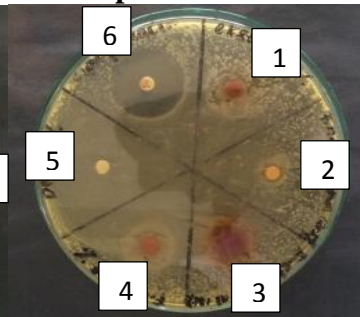
↓ ↓ ↓
50% 25% 12,5%

stok fraksi etil asetat

↓ ↓ ↓
50% 25% 12,5%

Stok fraksi *n*-heksana

↓ ↓ ↓
50% 25% 12,5%

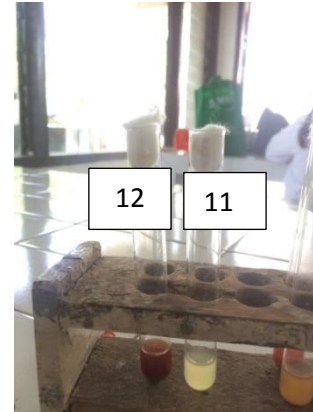
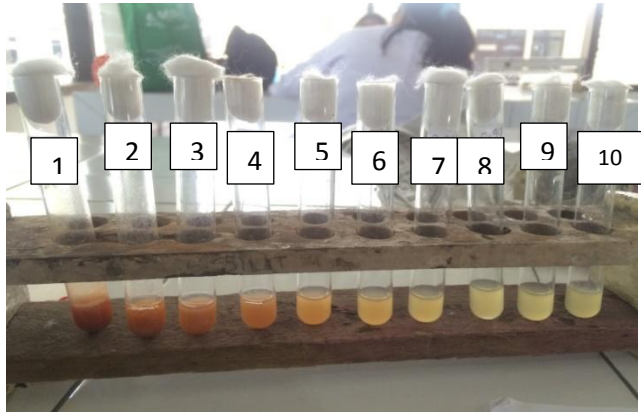
Konsentrasi 50%**Replikasi 1****replikasi 2****replikasi 3****Konsentrasi 25%****Replikasi 1****replikasi 2****replikasi 3****Konsentrasi 12,5%****Replikasi 1****replikasi 2****replikasi 3**

Keterangan :

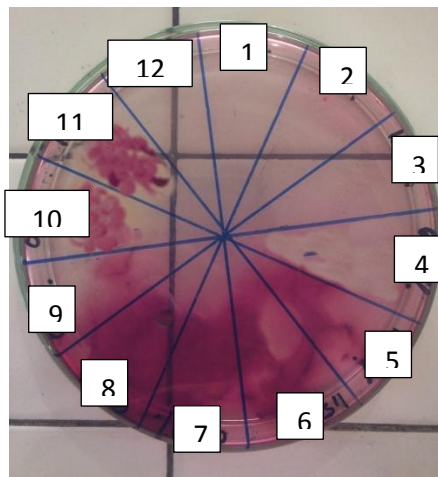
1. Siprofloksasin
2. Ekstrak etanol 50%
3. Fraksi *n*-heksana 50%
4. Fraksi etil asetat 50%
5. Fraksi air 50%
6. DMSO 5%

Lampiran 10. Hasil uji dilusi

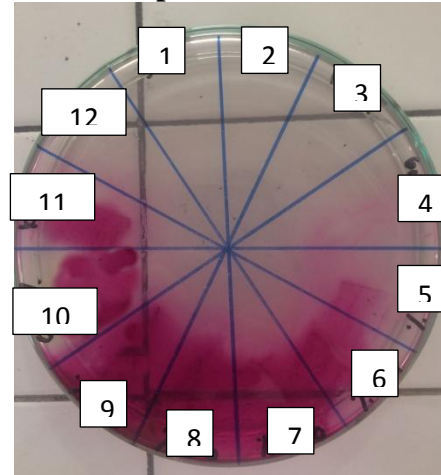
Larutan stok fraksi etil asetat



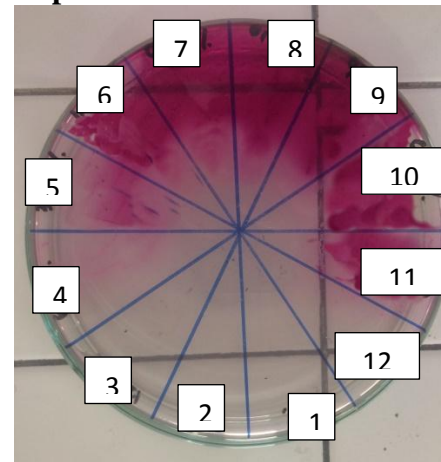
Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3



Keterangan :

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

Lampiran 11. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah akar bidara

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
6000	4000	66,67

$$\begin{aligned}\text{Persentase \%} &= \frac{\text{Bobot kering g}}{\text{Bobot basah g}} \times 100\% \\ &= \frac{6000}{4000} \times 100\% \\ &= 66,67\%\end{aligned}$$

Lampiran 12. Perhitungan persen rendemen ekstrak

Bobot serbuk (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
1000	236	23,6

Perhitungan :

$$\begin{aligned} \text{Rendemen \%} &= \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat serbuk}} \times 100\% \\ &= \frac{236}{1000} \times 100\% \\ &= 23,6\% \end{aligned}$$

Lampiran 13. Perhitungan persen rendemen fraksinasi akar bidara

Ekstrak etanol (g)	Pelarut	Hasil fraksi (g)	Rendemen (%)
120	<i>n</i> -heksana	3,91	3,26
	Etil asetat	10,85	9,04
	Air	70,32	58,6

Perhitungan :

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

1. Fraksi *n*-heksana

$$\begin{aligned} \text{Rendemen (\%)} &= \frac{3,91}{120} \times 100\% \\ &= 3,26 \% \end{aligned}$$

2. Fraksi etil asetat

$$\begin{aligned} \text{Rendemen (\%)} &= \frac{10,85}{120} \times 100\% \\ &= 9,04\% \end{aligned}$$

3. Fraksi air

$$\begin{aligned} \text{Rendemen (\%)} &= \frac{70,32}{120} \times 100\% \\ &= 58,6 \% \end{aligned}$$

Lampiran 14. Perhitungan dan pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari akar bidara

1. Konsentrasi 50% : 50 % b/v = 50 gram/100 mL

Menimbang 0,5 gram dilarutkan dengan DMSO 5% sampai 5 mL

2. Konsentrasi 25%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\ V_1 \cdot 50\% &= 1 \text{ mL} \cdot 25\% \\ &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Dipipet 0,5 mL dari sediaan 50% kemudian ditambah DMSO 5% sampai 1 mL.

3. Konsentrasi 12,5%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\ V_1 \cdot 25\% &= 1 \text{ mL} \cdot 12,5\% \\ &= 0,5\% \end{aligned}$$

Lampiran 15. Perhitungan larutan stok fraksi etil asetat dari akar bidara metode dilusi

Konsentrasi 50% = $b/v = 50 \text{ gram}/100\text{mL} = 1 \text{ gram}/2\text{mL}$

Tabung 1 : kontrol negatif (-) diisi 1 mL fraksi etil asetat

Tabung 2 : kontrol positif (+) diisi 1 mL suspensi bakteri

Tabung 3 : konsentrasi 25%

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

Tabung 4 : konsentrasi 12,5%

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

Tabung 5 : konsentrasi 6,25%

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

Tabung 6 : konsentrasi 3,13%

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

Tabung 7 : konsentrasi 1,56%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 3,13\% &= 1 \text{ mL} \cdot 1,56\% \\ V_1 &= \frac{1 \text{ mL} \cdot 1,56\%}{3,13\%} \\ V_1 &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Tabung 8 : konsentrasi 0,79%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 1,56\% &= 1 \text{ mL} \cdot 0,79\% \\ V_1 &= \frac{1 \text{ mL} \cdot 0,79\%}{1,56\%} \\ V_1 &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Tabung 9 : konsentrasi 0,40%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 0,79\% &= 1 \text{ mL} \cdot 0,40\% \\ V_1 &= \frac{1 \text{ mL} \cdot 0,40\%}{0,79\%} \\ V_1 &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Tabung 10 : konsentrasi 0,20%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 0,40\% &= 1 \text{ mL} \cdot 0,20\% \\ V_1 &= \frac{1 \text{ mL} \cdot 0,20\%}{0,40\%} \\ V_1 &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Tabung 11 : konsentrasi 0,10%

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 0,20\% &= 1 \text{ mL} \cdot 0,10\% \\ V_1 &= \frac{1 \text{ mL} \cdot 0,10\%}{0,20\%} \\ V_1 &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Lampiran 18. Hasil analisis Tukey dan tabel *Homogeneous Subsets*

Hasil uji Kolmogorov-Smirnov

Tujuan : untuk mengetahui kenormalan data sebagai syarat uji ANOVA

Kriteria uji :

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

Hasil :

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Sampel	42	7.50	4.080	1	14

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter hambatan
N		42
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	7.50
	Std. Deviation	4.080
Most Extreme Differences	Absolute	.090
	Positive	.090
	Negative	-.090
Kolmogorov-Smirnov Z		.585
Asymp. Sig. (2-tailed)		.884

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Kesimpulan : Sig > 0,05 maka data diameter hambatan terdistribusi normal.

Uji Leyene

Tujuan : untuk mengetahui homogenitas

Kriteria uji :

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

Hasil :

Test of Homogeneity of Variances

Diameter hambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.324	13	28	.258

Kesimpulan : Sig > 0,05 (H_0 diterima) maka data diameter hambat homogen

Uji *One Way* ANOVA

Tujuan : untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari diameter hambat dari setiap konsentrasi

Kriteria uji :

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

Hasil :

ANOVA

Diameter hambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2229.167	13	171.474	288.077	.000
Within Groups	16.667	28	.595		
Total	2245.833	41			

Kesimpulan : Sig < 0,05 (H_0 ditolak) maka terdapat perbedaan persen diameter hambat antar konsentrasi

Uji Post Hoc

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

Kriteria uji :

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

Hasil

Multiple Comparisons

Diameter hambatan

Tukey HSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Ekstrak 50%	Ekstrak 25%	2.00000	.62994	.141	-.3058	4.3058
	Ekstrak 12,5%	3.33333*	.62994	.001	1.0275	5.6392
	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	6.33333*	.62994	.000	4.0275	8.6392
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	7.66667*	.62994	.000	5.3608	9.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	7.66667*	.62994	.000	5.3608	9.9725
	Fraksi etil asetat 50%	-3.00000*	.62994	.003	-5.3058	-.6942
	Fraksi etil asetat 25%	-1.33333	.62994	.685	-3.6392	.9725
	Fraksi etil asetat 12,5%	1.33333	.62994	.685	-.9725	3.6392
	Fraksi air 50%	-2.33333*	.62994	.045	-4.6392	-.0275
	Fraksi air 25%	5.66667*	.62994	.000	3.3608	7.9725
	Fraksi 12,5%	7.33333*	.62994	.000	5.0275	9.6392
	Siprofloksasin	-18.33333*	.62994	.000	-20.6392	-16.0275
DMSO 5%	14.00000*	.62994	.000	11.6942	16.3058	
Ekstrak 25%	Ekstrak 50%	-2.00000	.62994	.141	-4.3058	.3058
	Ekstrak 12,5%	1.33333	.62994	.685	-.9725	3.6392
	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	4.33333*	.62994	.000	2.0275	6.6392
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	5.66667*	.62994	.000	3.3608	7.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	5.66667*	.62994	.000	3.3608	7.9725
	Fraksi etil asetat 50%	-5.00000*	.62994	.000	-7.3058	-2.6942
	Fraksi etil asetat 25%	-3.33333*	.62994	.001	-5.6392	-1.0275
	Fraksi etil asetat 12,5%	-.66667	.62994	.998	-2.9725	1.6392
	Fraksi air 50%	-4.33333*	.62994	.000	-6.6392	-2.0275
	Fraksi air 25%	3.66667*	.62994	.000	1.3608	5.9725

	Fraksi air 12,5%	5.33333*	.62994	.000	3.0275	7.6392
	Siprofloksasin	-20.33333*	.62994	.000	-22.6392	-18.0275
	DMSO 5%	12.00000*	.62994	.000	9.6942	14.3058
Ekstrak 12,5%	Ekstrak 50%	-3.33333*	.62994	.001	-5.6392	-1.0275
	Ekstrak 25%	-1.33333	.62994	.685	-3.6392	.9725
	Ekstrak 12,5%	3.00000*	.62994	.003	.6942	5.3058
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	4.33333*	.62994	.000	2.0275	6.6392
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	4.33333*	.62994	.000	2.0275	6.6392
	Fraksi etil asetat 50%	-6.33333*	.62994	.000	-8.6392	-4.0275
	Fraksi etil asetat 25%	-4.66667*	.62994	.000	-6.9725	-2.3608
	Fraksi etil asetat 12,5%	-2.00000	.62994	.141	-4.3058	.3058
	Fraksi air 50%	-5.66667*	.62994	.000	-7.9725	-3.3608
	Fraksi air 25%	2.33333*	.62994	.045	.0275	4.6392
	Fraksi air 12,5%	4.00000*	.62994	.000	1.6942	6.3058
	Siprofloksasin	-21.66667*	.62994	.000	-23.9725	-19.3608
	DMSO 5%	10.66667*	.62994	.000	8.3608	12.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	Ekstrak 50%	-6.33333*	.62994	.000	-8.6392
Ekstrak 25%		-4.33333*	.62994	.000	-6.6392	-2.0275
Ekstrak 12,5%		-3.00000*	.62994	.003	-5.3058	-.6942
Fraksi <i>n</i> -heksana 25%		1.33333	.62994	.685	-.9725	3.6392
Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%		1.33333	.62994	.685	-.9725	3.6392
Fraksi etil asetat 50%		-9.33333*	.62994	.000	-11.6392	-7.0275
Fraksi etil asetat 25%		-7.66667*	.62994	.000	-9.9725	-5.3608
Fraksi etil asetat 12,5%		-5.00000*	.62994	.000	-7.3058	-2.6942
Fraksi air 50%		-8.66667*	.62994	.000	-10.9725	-6.3608
Fraksi air 25%		-.66667	.62994	.998	-2.9725	1.6392
Fraksi air 12,5%		1.00000	.62994	.935	-1.3058	3.3058
Siprofloksasin		-24.66667*	.62994	.000	-26.9725	-22.3608
DMSO 5%		7.66667*	.62994	.000	5.3608	9.9725
Fraksi <i>n</i> -heksana 25%		Ekstrak 50%	-7.66667*	.62994	.000	-9.9725
	Ekstrak 25%	-5.66667*	.62994	.000	-7.9725	-3.3608
	Ekstrak 12,5%	-4.33333*	.62994	.000	-6.6392	-2.0275

	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	-1.33333	.62994	.685	-3.6392	.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	.00000	.62994	1.000	-2.3058	2.3058
	Fraksi etil asetat 50%	-10.66667*	.62994	.000	-12.9725	-8.3608
	Fraksi etil asetat 25%	-9.00000*	.62994	.000	-11.3058	-6.6942
	Fraksi etil asetat 12,5%	-6.33333*	.62994	.000	-8.6392	-4.0275
	Fraksi air 50%	-10.00000*	.62994	.000	-12.3058	-7.6942
	Fraksi air 25%	-2.00000	.62994	.141	-4.3058	.3058
	Fraksi air 12,5%	-.33333	.62994	1.000	-2.6392	1.9725
	Siprofloksasin	-26.00000*	.62994	.000	-28.3058	-23.6942
	DMSO 5%	6.33333*	.62994	.000	4.0275	8.6392
Fraksi <i>n</i> - heksana 12,5%	Ekstrak 50%	-7.66667*	.62994	.000	-9.9725	-5.3608
	Ekstrak 25%	-5.66667*	.62994	.000	-7.9725	-3.3608
	Ekstrak 12,5%	-4.33333*	.62994	.000	-6.6392	-2.0275
	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	-1.33333	.62994	.685	-3.6392	.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	.00000	.62994	1.000	-2.3058	2.3058
	Fraksi etil asetat 50%	-10.66667*	.62994	.000	-12.9725	-8.3608
	Fraksi etil asetat 25%	-9.00000*	.62994	.000	-11.3058	-6.6942
	Fraksi etil asetat 12,5%	-6.33333*	.62994	.000	-8.6392	-4.0275
	Fraksi air 50%	-10.00000*	.62994	.000	-12.3058	-7.6942
	Fraksi air 25%	-2.00000	.62994	.141	-4.3058	.3058
	Fraksi air 12,5%	-.33333	.62994	1.000	-2.6392	1.9725
	Siprofloksasin	-26.00000*	.62994	.000	-28.3058	-23.6942
	DMSO 5%	6.33333*	.62994	.000	4.0275	8.6392
Fraksi etil asetat 50%	Ekstrak 50%	3.00000*	.62994	.003	.6942	5.3058
	Ekstrak 25%	5.00000*	.62994	.000	2.6942	7.3058
	Ekstrak 12,5%	6.33333*	.62994	.000	4.0275	8.6392
	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	9.33333*	.62994	.000	7.0275	11.6392
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	10.66667*	.62994	.000	8.3608	12.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	10.66667*	.62994	.000	8.3608	12.9725
	Fraksi etil asetat 25%	1.66667	.62994	.358	-.6392	3.9725
	Fraksi etil asetat 12,5%	4.33333*	.62994	.000	2.0275	6.6392
	Fraksi air 50%	.66667	.62994	.998	-1.6392	2.9725

	Fraksi air 25%	8.66667*	.62994	.000	6.3608	10.9725
	Fraksi 12,5%	10.33333*	.62994	.000	8.0275	12.6392
	Siprofloksasin	-15.33333*	.62994	.000	-17.6392	-13.0275
	DMSO 5%	17.00000*	.62994	.000	14.6942	19.3058
Fraksi etil asetat 25%	Ekstrak 50%	1.33333	.62994	.685	-.9725	3.6392
	Ekstrak 25%	3.33333*	.62994	.001	1.0275	5.6392
	Ekstrak 12,5%	4.66667*	.62994	.000	2.3608	6.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	7.66667*	.62994	.000	5.3608	9.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	9.00000*	.62994	.000	6.6942	11.3058
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	9.00000*	.62994	.000	6.6942	11.3058
	Fraksi etil asetat 50%	-1.66667	.62994	.358	-3.9725	.6392
	Fraksi etil asetat 12,5%	2.66667*	.62994	.013	.3608	4.9725
	Fraksi air 50%	-1.00000	.62994	.935	-3.3058	1.3058
	Fraksi air 25%	7.00000*	.62994	.000	4.6942	9.3058
	Fraksi 12,5%	8.66667*	.62994	.000	6.3608	10.9725
	Siprofloksasin	-17.00000*	.62994	.000	-19.3058	-14.6942
	DMSO 5%	15.33333*	.62994	.000	13.0275	17.6392
Fraksi etil asetat 12,5%	Ekstrak 50%	-1.33333	.62994	.685	-3.6392	.9725
	Ekstrak 25%	.66667	.62994	.998	-1.6392	2.9725
	Ekstrak 12,5%	2.00000	.62994	.141	-.3058	4.3058
	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	5.00000*	.62994	.000	2.6942	7.3058
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	6.33333*	.62994	.000	4.0275	8.6392
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	6.33333*	.62994	.000	4.0275	8.6392
	Fraksi etil asetat 50%	-4.33333*	.62994	.000	-6.6392	-2.0275
	Fraksi etil asetat 25%	-2.66667*	.62994	.013	-4.9725	-.3608
	Fraksi air 50%	-3.66667*	.62994	.000	-5.9725	-1.3608
	Fraksi air 25%	4.33333*	.62994	.000	2.0275	6.6392
	Fraksi 12,5%	6.00000*	.62994	.000	3.6942	8.3058
	Siprofloksasin	-19.66667*	.62994	.000	-21.9725	-17.3608
	DMSO 5%	12.66667*	.62994	.000	10.3608	14.9725
Fraksi air 50%	Ekstrak 50%	2.33333*	.62994	.045	.0275	4.6392
	Ekstrak 25%	4.33333*	.62994	.000	2.0275	6.6392

	Ekstrak 12,5%	5.66667*	.62994	.000	3.3608	7.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	8.66667*	.62994	.000	6.3608	10.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	10.00000*	.62994	.000	7.6942	12.3058
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	10.00000*	.62994	.000	7.6942	12.3058
	Fraksi etil asetat 50%	-.66667	.62994	.998	-2.9725	1.6392
	Fraksi etil asetat 25%	1.00000	.62994	.935	-1.3058	3.3058
	Fraksi etil asetat 12,5%	3.66667*	.62994	.000	1.3608	5.9725
	Fraksi air 25%	8.00000*	.62994	.000	5.6942	10.3058
	Fraksi 12,5%	9.66667*	.62994	.000	7.3608	11.9725
	Siprofloksasin	-16.00000*	.62994	.000	-18.3058	-13.6942
	DMSO 5%	16.33333*	.62994	.000	14.0275	18.6392
	Ekstrak 50%	-5.66667*	.62994	.000	-7.9725	-3.3608
	Ekstrak 25%	-3.66667*	.62994	.000	-5.9725	-1.3608
	Ekstrak 12,5%	-2.33333*	.62994	.045	-4.6392	-.0275
	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	.66667	.62994	.998	-1.6392	2.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	2.00000	.62994	.141	-.3058	4.3058
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	2.00000	.62994	.141	-.3058	4.3058
Fraksi air 25%	Fraksi etil asetat 50%	-8.66667*	.62994	.000	-10.9725	-6.3608
	Fraksi etil asetat 25%	-7.00000*	.62994	.000	-9.3058	-4.6942
	Fraksi etil asetat 12,5%	-4.33333*	.62994	.000	-6.6392	-2.0275
	Fraksi air 50%	-8.00000*	.62994	.000	-10.3058	-5.6942
	Fraksi 12,5%	1.66667	.62994	.358	-.6392	3.9725
	Siprofloksasin	-24.00000*	.62994	.000	-26.3058	-21.6942
	DMSO 5%	8.33333*	.62994	.000	6.0275	10.6392
	Ekstrak 50%	-7.33333*	.62994	.000	-9.6392	-5.0275
	Ekstrak 25%	-5.33333*	.62994	.000	-7.6392	-3.0275
	Ekstrak 12,5%	-4.00000*	.62994	.000	-6.3058	-1.6942
Fraksi air 12,5%	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	-1.00000	.62994	.935	-3.3058	1.3058
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	.33333	.62994	1.000	-1.9725	2.6392
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	.33333	.62994	1.000	-1.9725	2.6392
	Fraksi etil asetat 50%	-10.33333*	.62994	.000	-12.6392	-8.0275
	Fraksi etil asetat 25%	-8.66667*	.62994	.000	-10.9725	-6.3608

	Fraksi etil asetat 12,5%	-6.00000*	.62994	.000	-8.3058	-3.6942
	Fraksi air 50%	-9.66667*	.62994	.000	-11.9725	-7.3608
	Fraksi 25%	-1.66667	.62994	.358	-3.9725	.6392
	Siprofloksasin	-25.66667*	.62994	.000	-27.9725	-23.3608
	DMSO 5%	6.66667*	.62994	.000	4.3608	8.9725
Siprofloksasin	Ekstrak 50%	18.33333*	.62994	.000	16.0275	20.6392
	Ekstrak 25%	20.33333*	.62994	.000	18.0275	22.6392
	Ekstrak 12,5%	21.66667*	.62994	.000	19.3608	23.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	24.66667*	.62994	.000	22.3608	26.9725
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	26.00000*	.62994	.000	23.6942	28.3058
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	26.00000*	.62994	.000	23.6942	28.3058
	Fraksi etil asetat 50%	15.33333*	.62994	.000	13.0275	17.6392
	Fraksi etil asetat 25%	17.00000*	.62994	.000	14.6942	19.3058
	Fraksi etil asetat 12,5%	19.66667*	.62994	.000	17.3608	21.9725
	Fraksi air 25%	16.00000*	.62994	.000	13.6942	18.3058
	Fraksi 25%	24.00000*	.62994	.000	21.6942	26.3058
	Fraksi air 12,5%	25.66667*	.62994	.000	23.3608	27.9725
	DMSO 5%	32.33333*	.62994	.000	30.0275	34.6392
DMSO 5%	Ekstrak 50%	-14.00000*	.62994	.000	-16.3058	-11.6942
	Ekstrak 25%	-12.00000*	.62994	.000	-14.3058	-9.6942
	Ekstrak 12,5%	-10.66667*	.62994	.000	-12.9725	-8.3608
	Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	-7.66667*	.62994	.000	-9.9725	-5.3608
	Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	-6.33333*	.62994	.000	-8.6392	-4.0275
	Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	-6.33333*	.62994	.000	-8.6392	-4.0275
	Fraksi etil asetat 50%	-17.00000*	.62994	.000	-19.3058	-14.6942
	Fraksi etil asetat 25%	-15.33333*	.62994	.000	-17.6392	-13.0275
	Fraksi etil asetat 12,5%	-12.66667*	.62994	.000	-14.9725	-10.3608
	Fraksi air 25%	-16.33333*	.62994	.000	-18.6392	-14.0275
	Fraksi 25%	-8.33333*	.62994	.000	-10.6392	-6.0275
	Fraksi air 12,5%	-6.66667*	.62994	.000	-8.9725	-4.3608
	Siprofloksasin	-32.33333*	.62994	.000	-34.6392	-30.0275

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

Diameter hambatan

Tukey HSDa

Sampel	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
DMSO 5%	3	.0000						
Fraksi <i>n</i> -heksana 12,5%	3		6.3333					
Ekstrak 12,5%	3		6.3333					
Fraksi air 12,5%	3		6.6667					
Fraksi <i>n</i> -heksana 25%	3		7.6667					
Ekstrak 25%	3		8.3333					
Fraksi <i>n</i> -heksana 50%	3			10.6667				
Fraksi air 25%	3			12.0000	12.0000			
Ekstrak 50%	3			12.6667	12.6667			
Fraksi etil asetat 12,5%	3				14.0000	14.0000		
Fraksi air 50%	3					15.3333	15.3333	
Fraksi etil asetat 25%	3						16.3333	
Fraksi etil asetat 50%	3						17.0000	
Siprofloksasin	3							32.3333
Sig.		1.0000	.141	.141	.141	.685	.358	1.0000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 19. Formulasi dan pembuatan media

1. Formulasi dan pembuatan *Endo Agar*

Peptone 10 gram

Lactose..... 10 gram

Dipotassium phosphate..... 3,5 gram

Bacteriological Agar.....10 gram

Ditimbang 33,5 gram bahan media, ditambahkan aquadest sampai 1000 mL. Panaskan sampai mendidih lalu ditambahkan 1 mL reagent Natrium sulfite 10% aduk sampai homogen. Disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Tunggu suhu sampai 50°C lalu tuang ke dalam cawan petri, simpan media pada suhu 8-15°C dan terlindung dari cahaya. pH media *Endo Agar* yaitu $7,5 \pm 0,2$ pada suhu 25°C.

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

Beef dehydrated infusion..... 2 gram

Casie hydrolysate 17,5 gram

Starch..... 1,5 gram

Agar-agar..... 17 gram

Ditimbang 38 gram bahan medium MHA, ditambahkan aquadest sampai 1000 mL aquadest, dipanaskan sampai mendidih. disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit lalu tunggu suhu sampai 45°C-50°C. Dituang ke dalam cawan petri steril dan simpan pada suhu 2-8°C. pH media MHA yaitu $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C.

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

Brain infusion 7,5 gram

Beef heart infusion 10 gram

Gelatin peptone..... 10 gram

Dextrose..... 2 gram

Sodium..... 2 gram

Sodium chloride 5 gram

Disodium phosphate 2,5 gram

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

4. Formulasi dan pembuatan *Kligler Iron Agar* (KIA)

Casein peptone 10 gram

Lactose..... 10 gram

Meat peptone 10 gram

Sodium chloride 5 gram

Dextrose..... 1 gram

Sodium thiosulfate..... 0,3 gram

Ferric ammonium citrate 0,2 gram

Phenol red..... 0,25 gram

Agar 12,5 gram

Ditimbang 49 gram bahan media KIA, ditambahkan aquadest sampai 1000 mL, dipanaskan sampai mendidih. disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. dimasukkan dalam tabung dengan posisi miring. pH media KIA yaitu $7,4 \pm 0,2$ pada suhu 25°C.

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

L-Lysine 10 gram

Gelatin peptone..... 5 gram

Yeast extract..... 3 gram

dextrose 1 gram

ferric ammonium citrate ... 0,50 gram

sodium thiosulfate 0,04 gram

Bromocresol purple 0,02 gram

Agar 13,5 gram

Ditimbang 33 gram media LIA, ditambahkan aquadest sampai 1000 mL, dipanaskan sampai mendidih. dimasukkan dalam tabung lalu sterilkan dalam

autoclave pada suhu 121°C selama 12 menit dan biarkan dalam posisi miring. Simpan medium pada suhu 8-15°C. pH media LIA yaitu $6,7 \pm 0,2$ pada suhu 25°C.

6. Formulasi dan pembuatan *Sulfide Indole Motility* (SIM)

Casien Digest Peptone.....	20	gram
Peptic Digest of Animal Tissue.....	6,1	gram
Ferrous Ammonium Citrate.....	0,2	gram
Sodium Thiosulfate	0,2	gram
Agar	3,5	gram

Ditimbang 30 gram media SIM, ditambahkan aquadest sampai 1000 mL aquadest, dipanaskan sampai mendidih. disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. pH media SIM yaitu $7,3 \pm 0,2$

7. Formulasi dan pembuatan *Simmons Citrate Agar*

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

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