

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA,  
ETIL ASETAT DAN AIR DAUN BUGENVIL (*Bougainvillea spectabilis*)  
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**



**Oleh:**

**Brigita Maria Febrina Asuk  
19133985A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA,  
ETIL ASETAT DAN AIR DAUN BUGENVIL (*Bougainvillea spectabilis*)  
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

*SKRIPSI*



*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai  
derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)*

*Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi*

**Oleh :**

**Brigita Maria Febrina Asuk  
19133985A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**PENGESAHAN SKRIPSI**  
Berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA,  
ETIL ASETAT DAN AIR DAUN BUGENVIL (*Bougainvillea spectabilis*)  
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Oleh :  
**Brigita Maria Febrina Asuk**  
19133985A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada tanggal : 8 Agustus 2017



Dekan,

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

Mengetahui,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi

Pembimbing,

Dr. Supriyadi, M.Si.

Pembimbing Pendamping,

Dra. Kartinah W, SU.

Penguji :

1. Dr. Ana Indrayati, M.Si.
2. Reslely Harjanti, S.Farm, M.Sc., Apt
3. Ghani Nurfiana Fadma Sari, M.Farm., Apt.
4. Dr. Supriyadi, M.Si.

## HALAMAN PERSEMBAHAN

“Akuilah Dia dalam segala lakumu, maka Ia akan meluruskan  
jalanmu”

(Amsal 3:6)

“Tuhan memberi kekuatan kepada yang lelah dan menambah  
semangat kepada yang tiada berdaya”

(Yesaya 40:29)

*Skripsi ini kupersembahkan untuk :*

*Tuhan Yesus dan Bunda Maria*

*Orang tua tercinta bapa Petrus Asuk dan mama Beatrix Dahu*

*Kakak-kakakku (Dewina, Erwin, Almi) dan kedua adikku (Ansi dan Oman)*

*Sahabat dan teman-teman rakat angkatan 2013 (Adelia, Ance, Avineldi,*

*Murni)*

*Almamaterku*

## **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 pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

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

Surakarta, 8 Agustus 2017



Brigita Maria Febrina Asuk

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah Bapa di surga yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “ **UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DAUN BUGENVIL (*Bougainvillea spectabilis*) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853** ”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, untuk itu penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada :

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Dr. Supriyadi, M.Si., selaku Dosen pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, arahan, nasehat, dan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Dra. Kartinah W, SU., selaku dosen pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan koreksi pada penulis.
5. Tim penguji (Dr. Ana Indrayati, M.Si., Reslery Harjanti, S.Farm, M.Sc., Apt., Ghani Nurfiana Fadma Sari, M.Farm., Apt.) yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan dan saran yang membangun untuk memperbaiki skripsi ini.
6. Segenap Dosen, Karyawan Dan Staf Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas setia Budi yang telah banyak membantu bagi kelancaran pelaksanaan skripsi ini.
7. Perpustakaan Universitas Setia Budi, tempat mencari sumber buku untuk menyelesaikan dan menyempurnakan skripsi ini.

8. Sahabat-sahabatku (Adelia, Ance, Murni, Neldi, Jhibug) yang selalu memberi bantuan, support dan semangat untuk penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Berbagai pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kelemahan dalam menyusun skripsi ini. Kritik dan saran dari siapapun yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Akhir kata semoga skripsi ini dapata bermanfaat bagi penulis dan pembaca supaya bisa menambah pengetahuan.

Surakarta, 8 Agustus 2017

Penulis

## DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL .....	i
PENGESAHAN SKRIPSI .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
PERNYATAAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
<b>BAB I    PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
A. Latar Belakang .....	1
B. Perumusan Masalah .....	2
C. Tujuan Penelitian .....	3
D. Kegunaan Penelitian.....	3
<b>BAB II    TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
A. Tanaman Bugenvil ( <i>Bougainvillea spectabilis</i> ).....	4
1. Sistematika tanaman.....	4
2. Nama Lain.....	4
3. Deskripsi Tanaman.....	4
4. Kandungan Kimia .....	5
4.1. Flavonoid. ....	5
4.2. Alkaloid.....	5
4.3. Tanin .....	6
4.4. Saponin .....	6
4.5. Triterpenoid .....	6
5. Manfaat dari tanaman .....	7
B. Simplisia .....	7
1. Pengertian simplisia .....	7
2. Pengeringan dan pencucian simplisia.....	8
C. Ekstraksi .....	8



1.	Pengertian ekstrak .....	8
2.	Metode Perkolasi.....	9
3.	Fraksinasi.....	9
4.	Cairan Penyari untuk ekstraksi .....	9
D.	Bakteri Uji .....	11
1.	Klasifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	11
1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. ....	11
1.2.	Patogenesis.....	12
E.	Media.....	12
F.	Antibakteri.....	13
1.	Pengertian antibakteri.....	13
2.	Mekanisme antibakteri .....	13
2.1	Penghambatan metabolisme sel bakteri.....	13
2.2	Penghambatan sintesis dinding sel.....	13
2.3	Perubahan permeabilitas membrane sel bakteri.....	14
2.4	Penghambatan sintesis protein sel bakteri. ....	14
2.5	Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. ....	14
G.	Uji Aktivitas Antibakteri .....	15
1.	Metode difusi .....	15
2.	Metode dilusi .....	15
H.	Sterilisasi .....	16
I.	Landasan Teori.....	16
 BAB III METODE PENELITIAN.....		19
A.	Populasi dan Sampel .....	19
B.	Variabel Penelitian.....	19
1.	Identifikasi variabel utama .....	19
2.	Klasifikasi variabel utama .....	19
3.	Definisi operasional variabel utama .....	20
C.	Bahan dan Alat.....	21
1.	Bahan.....	21
1.1.	Bahan sampel. ....	21
1.2.	Bakteri uji. ....	21
1.3.	Media.....	21
1.4.	Bahan kimia. ....	21
2.	Alat .....	21
D.	Jalannya Penelitian.....	22
1.	Identifikasi tanaman .....	22
2.	Pengambilan bahan .....	22
3.	Pembuatan serbuk daun bugenvil.....	22
4.	Penetapan susut pengeringan ekstrak daun bugenvil .....	22
5.	Pembuatan ekstrak etanol 70% .....	22
6.	Uji bebas etanol.....	23
7.	Pengujian kandungan senyawa kimia.....	23
7.1.	Flavonoid. ....	23
7.2.	Alkaloid. ....	23

7.3. Tanin.....	24
7.4. Saponin. ....	24
7.5. Triterpenoid. ....	24
8. Fraksinasi dari ekstrak etanol daun bugenvil.....	24
8.1. Pembuatan fraksi n-heksana daun bugenvil. ....	24
8.2. Fraksinasi etil asetat daun bugenvil. ....	24
8.3. Fraksinasi air daun bugenvil. ....	25
9. Sterilisasi.....	25
10. Identifikasi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	25
10.1. Identifikasi morfologi pada media <i>Pseudomonas</i> <i>Selective Agar</i> (PSA).....	25
10.2. Identifikasi bakteri dengan pengecatan Gram. ....	25
10.3. Identifikasi biokimia <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	25
11. Pembuatan suspensi bakteri uji .....	26
12. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif n-heksana, etil asetat, dan air.....	27
13. Analisis Hasil.....	28
E. Skema Jalannya Penelitian .....	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	32
A. Hasil Penelitian .....	32
1. Determinasi tanaman bugenvil ( <i>Bougainvillea spectabilis</i> ) .....	32
2. Pembuatan serbuk daun bugenvil.....	32
3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun bugenvil .....	33
4. Pembuatan ekstrak etanol daun bugenvil .....	34
5. Uji bebas etanol ekstrak daun bugenvil.....	34
6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi daun bugenvil .....	35
7. Fraksinasi.....	36
Keterangan: Rata-rata rendemen fraksi n-heksana 9,2%±SD 0,39, rata-rata rendemen fraksi etil asetat 16,8%±SD 0,70, rata-rata rendemen fraksi air 52,71%±SD 0,44. ....	36
7.1. Fraksi n-heksana. ....	36
7.2. Fraksi etil asetat. ....	37
7.3. Fraksi air. ....	37
8. Identifikasi bakteri uji <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	37
8.1. Identifikasi dengan penggoresan pada media PSA. ....	37
8.2. Identifikasi dengan pewarnaan Gram. ....	37
8.3. Identifikasi dengan uji biokimia. ....	38
9. Pembuatan suspensi bakteri uji .....	40
10. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi.....	40

11. Pengujian antibakteri fraksi teraktif daun bugenvil secara dilusi .....	42
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	45
A. Kesimpulan .....	45
B. Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA .....	46
LAMPIRAN .....	49

## DAFTAR GAMBAR

Halaman

1. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*)..... 29
2. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun bugenvil terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode difusi..... 30
3. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun bugenvil daun bugenvil terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode dilusi ..... 31

## DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Presentase bobot kering terhadap bobot basah daun bugenvil .....	33
2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun bugenvil dengan <i>Moisture Balance</i> .....	33
3. Hasil penetapan ekstrak daun bugenvil secara perkolasi .....	34
4. Hasil bebas etanol ekstrak perkolasi daun bugenvil .....	34
5. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun bugenvil .....	35
6. Rendemen hasil fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan fraksi air daun bugenvil .....	36
7. Hasil identifikasi dengan uji biokimia .....	38
8. Hasil uji aktivitas antibakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 metode difusi .....	40
9. Hasil aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak daun bugenvil terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara dilusi.....	43

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Determinasi tanaman bugenvil ( <i>Bougainvillea spectabilis</i> ).....	50
2. Gambar daun bugenvil dan serbuk daun bugenvil.....	51
3. Foto ekstrak daun bugenvil, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air .....	52
4. Foto identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun bugenvil .....	53
5. Foto suspensi bakteri uji dan hasil identifikasi bakteri uji <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	53
6. Foto pengenceran ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan air .....	56
7. Foto hasil uji difusi fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	57
8. Foto hasil uji dilusi fraksi teraktif terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	58
9. Foto alat <i>moisture balance</i> , perkolator , evaporator dan corong pisah .....	59
10. Foto alat timbangan, oven, autoklaf, inkas, inkubator dan vortex.....	60
11. Perhitungan presentase bobot kering terhadap bobot basah daun bugenvil.....	61
12. Perhitungan penetapan susut pengeringan menggunakan alat <i>Moisture balance</i> .....	61
13. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air .....	62
14. Formulasi dan pembuatan media .....	65
15. Perhitungan pengenceran DMSO 5 % ( <i>Dimethyl Sulfoxida</i> ) .....	68
16. Pembuatan konsentrasi kotrimoksazol .....	68
17. Pembuatan sediaan untuk uji difusi .....	68
18. Analisis data .....	72

## INTISARI

**ASUK, B.M.F., 2017., UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DAUN BUGENVIL (*Bougainvillea spectabilis*) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.**

Daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) mempunyai kandungan kimia flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan triterpenoid yang diduga memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun bugenvil (famili Nyctaginaceae) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Daun bugenvil diekstraksi menggunakan etanol 70% lalu difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Ekstrak dari hasil fraksi diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode dilusi dan difusi. Metode difusi dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% dan kontrol positif kotrimoksazol 4,8 mg. Metode dilusi menggunakan seri pengenceran 50%, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,12%. 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,1 %, 0,09%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri terbaik dibandingkan fraksi *n*-heksana, fraksi air, dan ekstrak etanol daun bugenvil. Aktivitas terbaik pada fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun bugenvil pada konsentrasi 50% dengan zona hambat 17,33 mm. KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun bugenvil yang dapat membunuh *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah konsentrasi 3,12%.

---

Kata kunci: daun bugenvil, fraksinasi, uji antibakteri, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

## ABSTRACT

**ASUK, B.M.F., 2017., TEST ANTIBACTERIAL ACTIVITY ETHANOL EXTRACT, *n*-HEXANE FRACTION, ETHYL ACETATE AND WATER BOUGAINVILLEA LEAF (*Bougainvillea spectabilis*) AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.**

Bougainvillea (*Bougainvillea spectabilis*) leaf has chemical contents of flavonoid, alkaloid, tannin, saponin and triterpenoids suspected of having antibacterial activity. This study aims to determine the ability of ethanol extract, fraction of *n*-hexane, ethyl acetate and water from the Bougainvillea leaf (family Nyctaginaceae) against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Bougainvillea leaf was extracted using percolation method with 70% ethanol and then fractionated using *n*-hexane, ethyl acetate and water. Extract and fractions were tested for their antibacterial activity using diffusion and dilution methods. Diffusion method with concentrations of 50%, 25%, 12.5% and a positive control cotrimoxazole 4.8 mg. Dilution method using serial dilutions of 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.1%, and 0.09%.

The results of this study showed that the fraction of ethyl acetate has the best antibacterial activity compared to the *n*-hexane fraction, water fraction, and leaf ethanol extract of bougainvillea leaf. The best activity in the ethyl acetate fraction of the ethanol extract of bougainvillea leaf at a concentration of 50%, with an inhibition zone of 17.33 mm. MCK (Minimum Killing Concentration) of the ethyl acetate fraction of the ethanol extract of bougainvillea leaf to kill *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 is a concentration of 3.12%.

---

Keyword: Bougainvillea leaf, fractionation, antibacterial assay, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Sepanjang sejarah manusia, jutaan orang meninggal dunia akibat infeksi bakteri. Infeksi dapat menular dari satu orang ke orang lain atau dari hewan ke manusia (Jawetz *et al* 2001). Infeksi pada manusia disebabkan oleh bakteri, jamur, virus, dan nematoda. Penyebab terbesar infeksi selain virus adalah bakteri (Umamaheswari 2008). Di negara berkembang angka kematiannya mencapai 39,5 juta, lebih dari 25% disebabkan oleh penyakit infeksi dan parasit (Dwiprahasto 2005). Prevalensi penyakit infeksi belum menunjukkan penurunan dari tahun ke tahun. Salah satu faktor penyebab tingginya kasus infeksi adalah pemakaian antibiotika yang telah resisten (Soleha *et al* 2009).

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi pada luka bakar yang menghasilkan nanah warna hijau, meningitis jika masuk melalui fungsi lumbal dan infeksi saluran kencing (Jawetz *et al* 2001). Bakteri ini menimbulkan infeksi apabila fungsi pertahanan inang abnormal, oleh karena itu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 disebut patogen oportunistik yaitu memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi. Bakteri ini juga tinggal pada manusia yang normal dan berlaku sebagai saprofit pada usus normal dan kulit manusia (Dwijoseputro 1990).

Antibiotik merupakan salah satu pilihan dalam menangani penyakit infeksi. Penggunaan beberapa antibiotik dari beberapa kombinasi yang semula dipercaya dapat memusnahkan bakteri penyebab infeksi, ternyata dapat menimbulkan masalah baru yaitu timbulnya bakteri yang resisten. Mengingat kandungan khasiat tanaman obat yang sangat bermanfaat bagi kesehatan terbukti efektif, efisien ekonomis, maka sudah saatnya jika pemanfaatan tanaman obat dioptimalkan. (Wijayakusuma *et al* 1992).

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat yaitu dari famili Nyctaginaceae atau famili bunga pukul empat. Famili ini memiliki 14 spesies

dengan tiga jenis tanaman hortikultura yaitu *Bougainvillea spectabilis* Willdenow, *Bougainvillea glabra* Choisy dan *Bougainvillea peruviana* Humbolt. Genus *Bougainvillea* merupakan tanaman asli dari Amerika Selatan yang namanya diturunkan dari Louis Antonie De Bougainville (1729-1811) yang ditemukan di Brasil pada tahun 1768 (Hajare *et al* 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Umamaheswari (2008) dan Rashid (2013) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun bugenvil mempunyai kandungan senyawa saponin, triterpenoid, alkaloid, tanin dan flavonoid. Zona hambatan yang terbentuk dari ekstrak etanol daun bugenvil untuk bakteri Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah sebesar 7 mm, ekstrak etil asetat sebesar 11 mm sementara ekstrak air tidak menunjukkan adanya zona hambatan (Umamaheswari 2008).

Metode yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi merupakan suatu uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan cakram (*disk*) kertas saring, sumuran atau suatu silinder tidak beralas. Metode ini dilakukan dengan memasukan larutan uji dengan konsentrasi tertentu kedalam sumuran kemudian dilihat diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekeliling cakram atau silinder yang berisi zat anti mikroba (Jawetz *et al* 2001). Metode dilusi bertujuan untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap menggunakan metode cair. Bakteri uji diinokulasi pada media tersebut, kemudian ditambahkan larutan uji dengan konsentrasi yang dapat menghambat atau mematikan bakteri.

Berdasarkan uraian tersebut, penulis tertarik untuk melakukan penelitian aktivitas antibakteri ekstrak etanol fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air daun *Bougainvillea spectabilis* terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

## **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut :

Pertama, apakah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ?

Kedua, Manakah dari ekstrak etanol atau ketiga fraksi yang memiliki aktivitas tertinggi terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ?

Ketiga, berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol atau fraksi yang paling aktif sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ?

### **C. Tujuan Penelitian**

Pertama, untuk mengetahui ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, Untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol atau ketiga fraksi yang paling aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ketiga, untuk mengetahui nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak atau fraksi teraktif daun bugenvil terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### **D. Kegunaan Penelitian**

Hasil penelitian diharapkan dapat memberi informasi kepada masyarakat bahwa tanaman bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) bukan hanya berfungsi sebagai tanaman hias tetapi daun bugenvil dapat berkhasiat sebagai antibakteri yang disebabkan oleh infeksi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Daun bugenvil juga dapat memberi sumbangan ilmu pengetahuan, khususnya dibidang obat tradisional dan dapat memberikan landasan bagi penelitian selanjutnya.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tanaman Bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*)**

##### **1. Sistematika tanaman**

Klasifikasi secara lengkap bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Caryophyllidae
Ordo	: Caryophyllales
Famili	: Nyctaginaceae
Genus	: Bougainvillea
Species	: <i>Bougainvillea spectabilis</i> Willd. ( <i>Unite State Departement of Agriculture</i> (USDA) 2016).

##### **2. Nama Lain**

Tanaman ini memiliki beberapa nama, diantaranya bunga kertas (Indonesia), great bougainvillea (Inggris), buganvilia (Brasil), ye zi hua (Cina), felila (Jepang) (*National Plant Germplasm System* (NPGS) 2004).

##### **3. Deskripsi Tanaman**

Bugenvil merupakan tanaman tropikal dan subtropikal berkayu, daun yang selalu hijau, dan termasuk tanaman perdu. Batangnya bercabang-cabang, dengan tinggi 15-40 kaki. Daun Bougainvillea gugur ketika tumbuh di tempat dengan musim kemarau yang panjang. Warna dari “bunga” Bougainvillea sebenarnya adalah seludang atau daun pelindung yang mengelilingi setiap bunga, panjangnya ½ - 2 inci, tipis seperti kertas dan berwarna-warni. Daunnya sederhana dan berseling, berwarna hijau tua. Sehelai daun panjangnya 2-4 inci, dengan bentuk yang bervariasi seperti bentuk bola, bulat lonjong, bulat telur atau bentuk hati.

Bunga yang sebenarnya kecil, panjang dan bulat seperti pipa, serta dikelilingi oleh seludang atau daun pelindung. Buahnya berbentuk bulat lonjong dengan panjang kurang dari 0,5 inci, pelindung buahnya kering dan keras (Gilman 1999; Kobayashi 2007)

#### **4. Kandungan Kimia**

**4.1. Flavonoid.** Flavonoid merupakan senyawa larut air serta dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap pada lapisan air setelah ekstrak ini dikocok dengan eter minyak bumi. Flavonoid merupakan senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau amonia. Senyawa ini terdapat dalam semua tumbuhan berpembuluh dan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid. Flavonoid dikatakan senyawa polar karena mempunyai gugus hidrofil (Markham K.R. 1988). Kegunaan flavonoid adalah sebagai antimikroba, antivirus, anti jamur. Flavonoid juga dapat digunakan sebagai inhibitor kuat pernapasan, untuk melindungi mukosa lambung dan antioksidannya dapat digunakan untuk mengobati gangguan fungsi hati (Robinson 1995).

Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstra selular yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri. Mekanisme kerjanya dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Kurniawati 2015).

**4.2. Alkaloid.** Senyawa organik umumnya berasal dari tumbuhan, strukturnya mengandung atom nitrogen dalam cincin heterosiklik ataupun nonheterosiklik dalam ikatan amina primer, sekunder, tersier atau quartener dan bersifat basa dan berasa pahit (Robinson 1995).

Mekanisme antibakteri alkaloid yang diduga dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh, terganggunya sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding selnya hanya meliputi membran sel. Keadaan ini menyebabkan sel bakteri mudah mengalami lisis, baik berupa fisik maupun osmotik dan menyebabkan kematian sel (Kurniawati 2015).

**4.3. Tanin.** Tanin merupakan senyawa yang tersebar luas dalam tumbuhan berpembuluh dalam angiospermae terdapat pada jaringan kayu. Dalam industri, tanin sering dipakai untuk mengubah kulit mentah menjadi siap pakai karena kemampuannya menyambung silang protein. Menurut batasannya Tanin dapat bereaksi dengan protein pembentuk kopolimer yang tidak larut dalam air. Tumbuhan bertanin dihindari oleh serangga karena rasanya sepat (Harbone 1987). Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuan untuk menginaktivasi adhesin sel mikroba juga meninaktifkan enzim dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Kurniawati 2015)

**4.4. Saponin.** Saponin merupakan senyawa aktif yang menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba (Robinson 1995). Penyarian saponin ini akan memberikan hasil yang lebih baik sebagai antibakteri jika menggunakan pelarut polar seperti etanol 70 % (Harbone 1987).

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 keluar dari sel bersama dengan zat-zat seperti air dan nutrisi dapat menyebabkan terhambat sehingga terjadi penurunan ATP yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan sel. Selanjutnya pertumbuhan sel bakteri menjadi terhambat dan menyebabkan kematian sel (Kurniawati 2015).

**4.5. Triterpenoid.** Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C-30 asiklik, yaitu skualena, senyawa ini tidak berwarna, berbentuk Kristal, bertitik leleh tinggi dan bersifat optis aktif. Senyawa triterpenoid dibagi

menjadi empat golongan yaitu: triterpen sebenarnya, saponin, steroid, dan glikosida jantung (Harbone 1897).

Mekanisme antibakteri senyawa triterpenoid umumnya terjadi melalui pengerusakan membrane sel bakteri karena sifat senyawa triterpenoid cenderung lipofilik. Kerusakan membrane sel dapat terjadi ketika senyawa aktif antibakteri bereaksi dengan sisi aktif dari membran atau dengan melarutkan konstituen lipid dan meningkatkan permeabilitasnya. Membran sel bakteri terdiri dari fosfolipid dan molekul protein. Akibat peningkatan permeabilitas, senyawa antibakteri dapat masuk ke dalam sel ketika di dalam sel, senyawa tersebut dapat melisis membran sel atau mengkoagulasi sitoplasma dari sel bakteri tersebut (Kurniawati 2015)

## **5. Manfaat dari tanaman**

*Bougainvillea spectabilis* dilaporkan memiliki khasiat pengobatan seperti antidiabetes, karena adanya D-pinitol (3-O-metilchiroinositol), antivirus, antiinflamasi, antioksidan dan memiliki potensi sebagai anti-fertiliti dan antimikroba. Daun bugenvil telah digunakan dalam pengobatan tradisional bangsa Meksiko untuk mengobati batuk, pilek, dan bronkitis (Hajare *et al* 2015).

## **B. Simplisia**

### **1. Pengertian simplisia**

Simplisia adalah bahan yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga atau dinyatakan lain berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan dikeluarkan dari tanaman atau isi sel dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya dan belum merupakan zat kimia murni.

Simplisia nabati harus memenuhi syarat-syarat kemurnian simplisia, diantaranya harus bebas dari serangga, fragmen, hewan atau kotoran hewan, tidak boleh menyimpang bau, warna, tidak boleh mengandung lendir dan cendawan atau menunjukkan tanda-tanda pengotor lain, tidak boleh mengandung bahan lain yang beracun atau berbahaya (Depkes 1986).

## **2. Pengeringan dan pencucian simplisia**

Bahan tanaman yang sudah dikumpul dilakukan pencucian pada air yang mengalir. Pencucian berguna untuk membersihkan tanaman dari kotoran yang melekat pada bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih. Misalnya air dari mata air, air sumur dan air dari PAM. Bahan simplisia yang mengandung zat yang mudah larut dalam air yang mengalir, hendaknya dilakukan pencucian dalam waktu yang sesingkat mungkin.

Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak karena terurai oleh enzim yang terdapat dalam bahan baku, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama dan untuk menjamin keawetan serta mencegah timbulnya jamur.

Pengeringan secara alamiah dapat dilakukan dengan panas sinar matahari langsung. Cara ini dilakukan untuk mengeringkan bagian tanaman yang relatif stabil apabila terkena panas. Pengeringan alamiah lainnya dengan diangin-anginkan dan tidak dikeringkan dibawah sinar matahari langsung. Cara ini terutama untuk mengeringkan bagian tanaman yang lunak seperti bunga dan daun. Pengeringan simplisia yang dilakukan menggunakan alat pengering harus memperhatikan jenis bahan baku, suhu pengeringan dan waktu pengeringan (Gunawan dan mulyani 2004).

## **C. Ekstraksi**

### **1. Pengertian ekstrak**

Ekstrak adalah sediaan yang dapat berupa kering, kental atau cair dibuat dengan cara menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang sesuai, yaitu maserasi, soxletasi, perkolasi atau penyeduhan dengan air mendidih Cairan penyari yang dapat digunakan berupa air, eter atau campuran etanol dalam air (Anief 2003).

Berdasarkan konsistensinya ekstrak dibedakan menjadi tiga, yakni ekstrak cair, ekstrak kental dan ekstrak kering. Ekstrak cair merupakan sediaan cair hasil dari penyarian simplisia. Ekstrak kental merupakan sediaan kental yang dibuat dari simplisia kemudian diuapkan pelarutnya. Ekstrak kering merupakan sediaan



yang berbentuk bubuk yang dibuat dari hasil tarikan simplisia yang diuapkan dengan pelarut hingga kering (Voigt 1995).

## **2. Metode Perkolasi**

Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Prinsip perkolasi adalah serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder yang bagian bawahnya diberi sekat berpori, cairan penyari dialirkan dari atas kebawah melalui serbuk tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat aktif sel-sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh.

Gerak kebawah disebabkan oleh kekuatan gaya beratnya sendiri dan cairan diatasnya. Kekuatan yang bergerak pada perkolasi antara lain gaya berat, kekentalan, daya larut, difusi, osmosa dan gaya gesekan.

Alat yang digunakan untuk perkolasi disebut percolator, cairan yang digunakan untuk menyari disebut cairan penyari atau menstrum, larutan zat aktif yang keluar dari perkolator disebut perkolat. Sedangkan sisa setelah dilakukan penyarian disebut ampas atau sisa perkolasi (Depkes 1986).

## **3. Fraksinasi**

Suatu cara untuk memisahkan golongan utama kandungan satu dari golongan utama kandungan yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan terjadi fraksi yang berbeda. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar akan masuk ke pelarut nonpolar dan senyawa yang semi polar akan masuk ke pelarut semi polar (Harborne 1987).

## **4. Cairan Penyari untuk ekstraksi**

Pemilihan larutan penyari juga harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh. Stabil secara kimia dan fisika, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif yaitu menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak mempengaruhi zat berkhasiat.

Etanol 70 % di pertimbangkan sebagai penyari karena etanol merupakan larutan penyari yang mudah di peroleh, stabil secara fisika dan kimia, selektif terhadap kapang dan kuman, tidak beracun, bereaksi netral, adsorbsinya baik,

tidak mempengaruhi zat berhasiat, mudah terbakar, panas yang dibutuhkan untuk pemekatan lebih sedikit, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan (List 2000).

Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, antarkuinon, flavonoid, steroid, damar, klorofil, tannin, saponin lemak dan malam, hanya sedikit yang larut. (Depkes 1986). Etanol tidak menyebabkan pembengkakan membran sel namun dapat memperbaiki stabilitas suatu bahan aktif yang optimal sehingga bahan pengotornya hanya dalam skala kecil turut dalam senyawa pengekstraksi (Voigt 1984).

Air merupakan pelarut polar, digunakan sebagai pelarut karena murah, mudah diperoleh, stabil, tidak menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah. Air melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tanin, gula, gom, pati, protein, enzim, lilin, pektin, zat warna dan asam organik (Depkes 1986).

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

Pelarut *n*-heksana merupakan pelarut non polar berupa cairan jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar dan mempunyai bau seperti eter lemah atau bau seperti petroleum, tidak dapat larut dalam air, dapat larut dalam alkohol, benzene, kloroform, eter. Pelarut *n*-heksana dapat melarutkan senyawa- senyawa nonpolar, misalnya golongan kandungan kimia minyak atsiri, lemak dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid dan karotenoid (Harbone 1987).

## D. Bakteri Uji

### 1. Klasifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Sistematika *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dalam taksonomi sebagai berikut :

Divisi : Protophyta

Kelas : Schizomycetes

Bangsa : Pseudomonadales

Suku : Pseudomonadaceae

Marga : *Pseudomonas*

Spesies : *Pseudomonas aeruginosa* (Dwijoseputro 1990).

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 termasuk bakteri Gram negatif, mempunyai flagel dan bergerak aktif, berukuran  $0,5-10 \times 3,0-4,0 \mu\text{m}$ . *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan bakteri aerob obligat yang tumbuh dengan mudah pada banyak jenis pembiakan, karena memiliki kebutuhan nutrisi yang sangat sederhana. Medium paling sederhana untuk pertumbuhannya terdiri dari asetat (untuk karbon) dan amonium sulfat (untuk nitrogen). Metabolisme bersifat respiratorik tetapi dapat tumbuh tanpa  $\text{O}_2$  bila tersedia  $\text{NO}_3$  sebagai aseptor elektron. Kadang-kadang berbau manis atau menyerupai anggur yang dihasilkan aminoasetofenon dan beberapa strain menghemolisis darah. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 membentuk koloni yang bundar dan licin dengan warna kehijauan berfluoresensi.

**1.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.** Tumbuh dengan baik pada suhu  $37-42^{\circ}\text{C}$ , perubahannya pada suhu  $42^{\circ}\text{C}$  membantu membedakannya dari spesies *Pseudomonas* lain dalam kelompok fluoresens. Bakteri ini oksidase positif, nonfermenter, tetapi banyak strain mengoksidasi glukosa (Mayasari 2005). Golongan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat termasuk proteolitik dan lipolitik. Tipe proteolitik adalah tipe yang mampu merombak kasein menjadi peptida yang dapat diuraikan lebih lanjut menjadi asam amino, sedangkan yang termasuk tipe lipolitik mamou menghidrolisa susu dan lemak yang kemudian akan diurai lebih lanjut menjadi gliserol dan asam lemak yang dapat menyebabkan tengik (Radji 2010).

**1.2. Patogenesis.** Kemampuan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menyerang jaringan bergantung pada produksi enzim-enzim dan toksin-toksin yang merusak barrier tubuh dan sel-sel inang. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bersifat patogen hanya bila memasuki daerah dengan sistem pertahanan yang tidak normal, misalnya saat membran mukosa dan kulit robek karena kerusakan jaringan langsung sewaktu penggunaan kateter intravena atau kateter air kemih, atau bila terdapat neutropenia seperti pada kemoterapi kanker (Mayasari 2005).

### **E. Media**

Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran nutrisi zat makanan yang dipakai untuk menumbuhkan mikroba. Persyaratan suatu medium adalah harus mengandung semua nutrient, mudah digunakan bakteri, harus mempunyai tekanan osmose, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba, tidak mengandung zat-zat penghambat dan harus steril (Suryono 1995). Media harus dalam keadaan steril artinya sebelum ditanami mikroba yang di maksud tidak ditumbuhi mikroba lain. Pertumbuhan mikroorganisme di laboratorium disebut media kultur. Pengetahuan tentang habitat normal mikroorganisme sangat membantu dalam pemilihan media yang cocok untuk pertumbuhan mikroorganisme di laboratorium (Pratiwi 2008).

Bentuk media ditentukan oleh ada tidaknya penambahan zat pematik seperti agar-agar, gelatin, dan sebagainya, maka bentuk media dikenal ada tiga jenis. Media padat (*Solid media*) dibuat dengan penambahan 12-15 gram tepung agar-agar per 1.000 ml media. Media yang memerlukan kadar air tinggi, maka jumlah tepung agar-agar harus rendah, tetapi untuk jenis media yang memerlukan kandungan air rendah penambahan tepung agar harus banyak. Media padat umumnya diperlukan untuk bakteri, ragi, jamur, dan kadang - kadang juga mikroalga. Media cair (*liquid media*) tidak ditambahkan zat pematik, biasanya media cair dipergunakan untuk perbakaan mikroalga tetapi juga mikro lain, terutama bakteri dan ragi. Media semi cair (*semi solid*) digunakan untuk menguji

ada atau tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi, penambahan zat pematid hanya 50% atau kurang dari yang seharusnya. Umumnya diperlukan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup aerobik atau fakultatif (Suriawiria 1986).

## F. Antibakteri

### 1. Pengertian antibakteri

Antibakteri adalah suatu bahan obat yang dapat membasmi bakteri pada umumnya, khususnya mikroba yang merugikan manusia berdasarkan sifat toksisitas selektif. Antibakteri dapat berupa zat yang hanya menghambat pertumbuhan disebut bakterostatik sedangkan antibakteri yang dapat membunuh bakteri disebut bakterisid (Ganiswara 1995).

### 2. Mekanisme antibakteri

Mekanisme antibakteri merupakan peristiwa penghambatan bakteri oleh antibakteri. Aktivitas antibakteri diukur secara invitro untuk menentukan potensi agen antibakteri dalam larutan, konsentrasinya dalam cairan tubuh atau jaringan dan kepekaan mikroorganisme penyebab terhadap obat yang diketahui (Jawetz *et al* 1986).

Berdasarkan mekanisme kerjanya antibakteri dibagi dalam 5 kelompok yaitu :

**2.1 Penghambatan metabolisme sel bakteri.** Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari Para Amino Benzoic Acid (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antimikroba bila bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional sehingga kebutuhan akan asam folat tidak terpenuhi dan bisa menyebabkan bakteri mati (Ganiswara 1995).

**2.2 Penghambatan sintesis dinding sel.** Bakteri terdiri atas polipeptidoglikan yaitu suatu kelompok polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Ganiswara 1995).

**2.3 Perubahan permeabilitas membrane sel bakteri.** Selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat - zat yang terlarut lainnya. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Ganiswara 1995).

**2.4 Penghambatan sintesis protein sel bakteri.** Bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu mekanisme kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein yang abnormal dan fungsional bagi sel bakteri (Ganiswara 1995).

**2.5 Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein.** Antibakteri yang memiliki mekanisme kerja ini pada umumnya bersifat toksik kurang selektif, karena antibakteri ini bersifat sitotoksik terhadap sel tubuh hospes, sehingga hanya bersifat sitotoksik yang masih dapat diterima sebagai antibakteri (Ganiswara 1995).

## **G. Kotrimoksasol**

Kotrimoksasol (koti) adalah kombinasi dua obat antibiotik (antibakteri) kombinasi sulfametoksasol dan trimetopim. Penggunaan kotrimoksasol pada penelitian ini karena kotrimoksasol merupakan antibiotik yang poten dan aktif dalam membunuh bakteri Gram negatif salah satunya adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Mekanisme kerja sulfametoksazol adalah dengan menghambat sintesis asam folat, sedangkan trimetoprim menghambat reduksi asam dihydrofolat menjadi tetrahydrofolat sehingga menghambat enzim pada alur sintesis asam folat. Kombinasi yang bersifat sinergis ini menyebabkan pemakaian yang luas pada terapi infeksi *community-acquired* seperti sinusitis, otitis media akut, infeksi saluran kencing (Ganiswara 1995).

## G. Uji Aktivitas Antibakteri

### 1. Metode difusi

Metode difusi adalah suatu uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan cakram (*disk*) kertas saring, sumuran atau suatu silinder tidak beralas. Metode ini dilakukan dengan memasukan larutan uji dengan konsentrasi tertentu kedalam sumuran. Metode ini zat yang akan ditentukan aktivitas anti mikroba berdifusi pada lempeng *Muller Hinton Agar* yang telah ditanami mikroba yang akan diuji. Dasar penggunaannya adalah terbentuk atau tidaknya diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekeliling cakram atau silinder yang berisi zat anti mikroba. Keuntungan metode difusi adalah ekonomis dan sederhana (Jawetz *et al* 2001).

### 2. Metode dilusi

Metode dilusi adalah metode yang menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Prinsip metode dilusi adalah penghambatan pertumbuhan dan kuman dalam kultur cair oleh suatu obat yang dicampurkan didalam kultur.

Kultur yang dipakai harus merupakan kultur yang dapat membunuh kuman secara optimum dan tidak menetralkan obat yang digunakan Metode dilusi dilakukan dengan cara membuat suatu seri konsentrasi yang terdiri dari beberapa tabung reaksi. Masing-masing tabung ditambahkan bahan uji yang akan diperiksa kecuali tabung untuk kontrol positif, kemudian ditambahkan bakteri yang telah diencerkan 1:1000 kedalam tiap-tiap tabung reaksi kecuali untuk kontrol negatif (Bonang dan koeswardono 1982).

Hasil yang diperoleh lebih teliti Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Maksimum (KBM) dapat ditentukan, lebih mudah dan praktis. Keuntungan metode ini adalah memberikan hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri. Kekurangan metode ini sampel yang digunakan untuk penelitian harus jernih, karena jika keruh dapat mempersulit pengamatan (Jawetz *et al* 2012).

## H. Sterilisasi

Bahan dan peralatan yang digunakan dalam bidang mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak ditumbuhi mikrob hidup atau ditumbuhi bakteri, baik yang patogen maupun non patogen, baik dalam bentuk vegetatif maupun nonvegetatif (bentuk spora) yang akan merusak media dan mengganggu proses yang dikerjakan. Steril didapatkan melalui proses sterilisasi, cara sterilisasi yang umum digunakan adalah sterilisasi secara fisik misalnya dengan pemanasan, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar X, sinar gamma, sinar ultraviolet, secara kimia, misal dengan penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin, sterilisasi secara mekanik misal dengan penggunaan saringan atau filter (Suriawiria 1986).

## I. Landasan Teori

Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai antibakteri adalah *Bougainvillea spectabilis* Willdenow. Penelitian yang dilakukan oleh Umamaheswari (2008) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun bugenvil yang diekstraksi menggunakan metode maserasi mempunyai kandungan senyawa saponin, triterpenoid, alkaloid dan tanin. Penelitian lain yang dilakukan oleh Rashid (2013) juga melaporkan bahwa ekstrak etanol daun bugenvil yang diekstraksi menggunakan metode sokletasi mempunyai kandungan senyawa flavonoid dan tanin. Zona hambatan yang terbentuk dari ekstrak etanol daun bugenvil untuk bakteri Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah sebesar 7 mm, ekstrak etil asetat sebesar 11 mm sementara ekstrak air tidak menunjukkan adanya zona hambatan Umamaheswari (2008) .

Penelitian tersebut memberikan pemikiran kepada penulis bahwa daun bugenvil juga mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Penelitian ini penulis ingin membuktikan bahwa ekstrak perkolasi dan fraksinasi daun bugenvil memiliki efek terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Prinsip perkolasi adalah serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder yang



bagian bawahnya diberi sekat berpori, cairan penyari dialirkan dari atas kebawah melalui serbuk tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat aktif sel-sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh (Depkes 1986).

Fraksinasi adalah suatu cara untuk memisahkan golongan utama, kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawa yang setelah dipisahkan akan terjadi fraksi yang berbeda, senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar akan masuk kepelarut nonpolar (Harborne 1987).

Pelarut yang digunakan untuk fraksinasi dalam penelitian ini adalah *n*-heksan, etil asetat dan air. *n*-heksan merupakan pelarut nonpolar, berupa cairan jernih, mudah menguap, berbau seperti eter, tidak larut dalam air, dapat melarutkan terpenoid, steroid, triterpenoid (Harbone 1987). Etil asetat merupakan pelarut yang semi polar, mudah menguap dan terbakar, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas. Senyawa yang larut dalam pelarut ini adalah flavonoid, alkaloid dan polifenol. Air adalah pelarut polar yang dapat melarutkan senyawa polar seperti flavonoid, tanin, pati, protein, lender, lilin, pectin, lemak, zat warna dan asam organik (Depkes 1986).

Bakteri yang digunakan untuk penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan bakteri Gram negatif, mempunyai flagel, dan bergerak aktif berukuran 0.5-10 x 3,0-4,0 µm. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tumbuh dengan baik pada suhu 37-42<sup>0</sup>C, perubahannya pada suhu 42<sup>0</sup>C membantu membedakannya dari spesies *Pseudomonas* lain dalam kelompok fluoresens. Bakteri ini oksidase positif, nonfermenter, tetapi banyak strain mengoksidasi glukosa (Mayasari 2005). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat menyebabkan infeksi pada luka bakar yang menghasilkan nanah warna hijau. meningitis jika masuk melalui fungsi lumbal dan infeksi saluran kencing (Jawetz *et al* 2001).

Metode yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi adalah suatu uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan cakram (*disk*) kertas saring, sumuran atau suatu silinder tidak

beralas. Dilakukan dengan memasukan larutan uji dengan konsentrasi tertentu kedalam sumuran. Dasar penggunaannya adalah terbentuk atau tidaknya diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekeliling cakram atau silinder yang berisi zat antimikroba. Metode dilusi bertujuan untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap menggunakan metode cair (Jawetz *et al* 2001).

## H. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini yaitu :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, fraksi etil asetat dari daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) yang paling aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ketiga, nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat diketahui.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) yang diambil dari Atambua, Nusa Tenggara Timur.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) yang berbentuk oval, berdaun lebar, berwarna hijau, tidak terkena hama dan diambil dari Atambua Nusa Tenggara Timur, yang diambil secara acak.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama adalah ekstrak daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) yang diekstraksi dengan metode perkolasi menggunakan larutan penyari etanol 70% dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan *n*-heksana, etil asetat dan air.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari perkolasi, fraksi air, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air. Terhadap bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan terhadap berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang bila bersama variabel lain, variabel berubah dalam variasinya. Variabel tergantung adalah variabel yang berubah karena variabel bebas. Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi 50%; 25%; 12,5 %; dan konsentrasi 50%; 25%; 12,5 %; 6,2%; 3,1%; 1,5%; 0,7 %; 0,3 %; 0,1 %; 0,09% ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) yang diuji pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode difusi dan dilusi.

Variabel tergantung dalam penelitian ini pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang dipengaruhi oleh ekstrak daun bugenvil secara perkolasi fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yang dilihat dari pertumbuhannya pada media selektif.

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, kondisi laboratorium, media yang digunakan dalam penelitian, metode penelitian, tempat tumbuh tanaman, waktu panen, dan metode ekstraksi perkolasi.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun bugenvil yang diambil dari Atambua, Nusa Tenggara Timur, yang berbentuk oval, berdaun lebar, berwarna hijau pada bulan November 2016 dari Atambua Nusa Tenggara Timur.

Kedua, daun bugenvil adalah daun yang dibersihkan dari pengotor, kemudian di keringkan dengan cara dikeringkan dibawah naungan, kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak daun bugenvil adalah hasil ekstraksi serbuk daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) yang diekstraksi dengan pelarut etanol 70 % menggunakan metode perkolasi dan dilanjutkan dengan fraksinasi dengan dan *n*-heksana sebagai pelarut non-polar, etil asetat sebagai pelarut semi polar, air sebagai pelarut polar.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah hasil fraksinasi dari ekstrak perkolasi daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) dalam etanol 70% dengan menggunakan *n*-heksana sebagai pelarut non-polar, kemudian dipekatkan pada oven sehingga didapat fraksi *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat adalah hasil fraksinasi dari ekstrak perkolasi daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) dalam etanol 70% dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar, kemudian dipekatkan pada oven sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah hasil fraksinasi dari ekstrak perkolasi daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) dalam etanol 70% dengan menggunakan air sebagai pelarut polar, kemudian dipekatkan pada oven sehingga didapat fraksi air.

Ketujuh, bakteri uji dalam penelitian ini adalah bakteri Gram negatif yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri adalah uji aktivitas antibiotik *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 terhadap bakteri dengan menggunakan metode difusi untuk mengukur diameter zona hambat, metode dilusi untuk mengukur Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi 50%; 25%; 12,5 %; 6,2%; 3,1%; 1,5%; 0,7 %; 0,3 %; 0,1 %; 0,09%.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Bahan

**1.1. Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) yang diambil dari Atambua, Nusa Tenggara Timur.

**1.2. Bakteri uji.** Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**1.3. Media.** Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Muller Hinton Agar* (MHA), *Pseudomonas Selective Agar* (PSA), SIM (*Sulfida Indol Motility*), KIA (*Kliger Iron Agar*), LIA (*Lysin Iron Agar*), citrat.

**1.4. Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, *n*-heksana, etil asetat dan akuades.

### 2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven dengan suhu rendah dan konstan, alat penyerbuk, *moisture balance*, timbangan analitik, boorprop, evaporator. Alat perkolasi meliputi corong, erlemeyer, botol cairan penyari, kerean, gabus bertoreh, kertas saring, dan aluminium voil. Alat gelas lain yang digunakan seperti gelas ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, cawan penguap, corong pisah, alat untuk uji kualitatif seperti tabung reaksi.

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

#### **D. Jalannya Penelitian**

##### **1. Identifikasi tanaman**

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*), dengan mencocokkan ciri morfologi yang ada pada daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) dengan acuan buku, serta dibuktikan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

##### **2. Pengambilan bahan**

Sampel daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) yang diambil dari Atambua, Nusa Tenggara Timur.

##### **3. Pembuatan serbuk daun bugenvil**

Daun bugenvil diperoleh dari Atambua, Nusa Tenggara Timur, pembuatan serbuk daun bugenvil dilakukan dengan cara daun bugenvil dicuci bersih pada air mengalir, agar terbebas dari kotoran dan debu, kemudian dikeringkan dibawah naungan, setelah itu diserbuk dengan alat penyerbuk serta diayak dengan menggunakan ayakan no. 40 sampai serbuk terayak habis.

##### **4. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun bugenvil**

Penetapan susut pengeringan serbuk daun dilakukan dengan alat *moisture balance*, caranya dengan menimbang 2 gram ekstrak daun bugenvil kemudian diukur susut pengeringan dengan *moisture balance*, dengan suhu 105<sup>0</sup>C, kemudian ditunggu sampai alat *moisture balance* berbunyi dimana menandakan hasil analisis telah selesai. Susut pengeringan akan memenuhi syarat apabila kadar air dari simplisia tidak lebih dari 10%.

##### **5. Pembuatan ekstrak etanol 70%**

Serbuk daun bugenvil dilakukan dengan ekstraksi dengan metode perkolasi dengan tujuan senyawa yang tidak tahan pemanasan ikut tersari serta etanol 70% agar senyawa baik polar, semi polar dan nonpolar dapat terlarut dan

tersari. Serbuk daun bugenvil ditimbang sebanyak 800 gram. Sebelum serbuk dimasukan ke dalam percolator serbuk sebaiknya dibasahi terlebih dahulu dengan etanol kemudian dibiarkan selama 1 hari. Tujuannya agar tidak terbentuk rongga diantara serbuk sehingga menyebabkan serbuk susah dialiri pelarut. Serbuk yang telah dibasahi kemudian dimasukan kedalam percolator. Serbuk dibasahi etanol 70% dengan perbandingan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok dengan 2,5 bagian cairan penyari sampai terbasahi semua, kemudian ditutup dan didiamkan selama 24 jam. Massa dipindahkan sedikit demi sedikit kedalam percolator yang bagian bawahnya sudah diberi *glasswall* sambil sesekali ditekan dengan hati-hati, dituangi dengan pelarut secukupnya sampai cairan mulai menetes dan diatas simplisia dibiarkan selapis cairan penyari. Perkolasi dihentikan setelah cairan tidak berwarna mulai menetes. Hasil dari perkolasi dipekatkan dalam evaporator pada suhu 65 °C.

## **6. Uji bebas etanol**

Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bila etanol tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol. Tujuan dilakukannya tes bebas etanol ini agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri.

## **7. Pengujian kandungan senyawa kimia**

Identifikasi senyawa ini dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

**7.1. Flavonoid.** Pada ekstrak dan fraksi daun bugenvil dilarutkan dalam 10 ml air dipanaskan 15 menit kemudian disaring. Filtratnya ditambahkan sedikit serbuk Mg dan 2 ml larutan etanol-asam klorida (1: 1) dan pelarut amil alkohol. Campuran ini dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan beberapa saat agar memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harbone 2006).

**7.2. Alkaloid.** Pada ekstrak dan fraksi daun bugenvil ditimbang sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan akuadestilata setelah itu disaring sebanyak dua kali dan ditambahkan larutan HCl 2 M sebanyak 1 sampai 2 tetes. Selanjutnya ditetesi

pereaksi mayer terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dan dengan Dragendrof terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, maka ada kemungkinan terdapat alkaloid (Depkes 1989).

**7.3. Tanin.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi ditambahkan 10 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit dan disaring. Kemudian filtrat yang diperoleh ditambahkan 5 ml pereaksi besi (III) klorida. Perubahan warna biru kehitaman atau coklat kehitaman menunjukkan adanya kandungan tannin (Robinson 1995).

**7.4. Saponin.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi daun bugenvil dimasukkan dalam tabung, kemudian ditambah air panas 10 ml, didinginkan lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Saponin positif bila terbentuk buih yang mantap setinggi 1 cm sampai 10 cm. Penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang (Depkes 1989).

**7.5. Triterpenoid.** Sebanyak 1 gram ekstrak dan fraksi daun bugenvil ditambahkan 10 ml kloroform. Larutan diambil 5 ml dan kemudian diuapkan dalam cawan penguap. Selanjutnya ditambahkan 1-2 ml asam sulfat dengan pipet (reaksi Lieber Burchard). Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah kecoklatan atau ungu (Harborne 1987).

## **8. Fraksinasi dari ekstrak etanol daun bugenvil**

**8.1. Pembuatan fraksi n-heksana daun bugenvil.** Ekstrak etanol 70% sebanyak 10 g yang telah disuspensikan dengan air difraksinasi dengan pelarut n-heksan 75 ml dalam corong pisah, fraksi yang ada diatas (fraksi n-heksana) dipisahkan dengan fraksi yang bagian bawah (fraksi air) dilakukan dengan penambahan n-heksana sebanyak 3 kali. Fraksi n-heksana yang didapat kemudian dipekatkan di oven pada suhu 40<sup>0</sup>C.

**8.2. Fraksinasi etil asetat daun bugenvil.** Hasil sisa fraksinasi dengan n-heksana difraksinasi dengan pelarut etil asetat 75 ml dalam corong pisah. Filtrat yang dibawah fraksi (fraksi air) dipisahkan dengan filtrat yang bagian atas (fraksi etil asetat, dilakukan dengan penambahan pelarut sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat yang didapat kemudian dipekatkan di oven pada suhu 40<sup>0</sup>C.



**8.3. Fraksinasi air daun bugenvil.** Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air. filtrat yang telah di peroleh kemudian dipekatkan dengan *water bath* pada suhu 30 - 100<sup>0</sup> C sampai kental.

## **9. Sterilisasi**

Sterilisasi inkas dengan menggunakan formalin, media agar yang digunakan disterilisasikan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilisasikan dengan oven pada suhu 170<sup>0</sup>C-180<sup>0</sup>C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilisasi dengan pemanasan api langsung (Jawetz *et al* 2012).

## **10. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

**10.1. Identifikasi morfologi pada media *Pseudomonas Selective Agar (PSA)*.** Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasi pada media *Pseudomonas Selective Agar (PSA)* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Penampakan membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen berwarna kehijauan (Jawetz *et al* 2007).

**10.2. Identifikasi bakteri dengan pengecatan Gram.** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang. Pewarnaan Gram berguna untuk dapat meyakinkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan bakteri Gram negatif. Pewarnaan Gram dimulai dengan pemberian zat warna dasar kristal violet. Larutan iodin diberikan selanjutnya, seluruh bakteri akan terwarnai biru pada tahap ini dalam proses pewarnaan. Kemudian sel diberikan alkohol. Sel Gram positif akan tetap mempertahankan kompleks kristal violet-iodin sehingga tetap berwarna biru sel Gram negatif akan kehilangan warna oleh alkohol. Sebagai langkah akhir, zat akhir lawan, safranin (pewarna merah) diberikan sehingga sel-sel Gram negatif yang tidak berwarna akan berwarna merah sedangkan sel Gram positif akan tetap berwarna ungu (Jawetz *et al* 2012).

## **10.3. Identifikasi biokimia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.**

**10.3.1 Media SIM (*Sulfida Indol Motility*).** Biakan murni bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan, kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji adanya

sulfida, indol dan motilitas. Uji sulfida positif bila media berwarna hitam. Uji indol positif bila media berwarna merah setelah ditambah dengan pereaksi *Erlich* A dan B. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada bekas tusukan (Bonang dan Koeswandro 1982). .

**10.3.2 Media *Klinger Iron Agar* (KIA).** Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam, identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida, selanjutnya diamati pada lereng dasar terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada bagian lereng dasar, terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada bagian lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), bentuk gas yang ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+) (Bonang dan Koeswandro 1982). .

**10.3.3 Media *Lysin Iron Agar* (LIA).** Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam., identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi lisin dan sulfide. Selanjutnya diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif, maka lereng akan berwarna merah coklat (ditulis R), berwarna ungu (ditulis K), berwarna kuning (ditulis A), disertai terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+) (Bonang dan Koeswandro 1982).

**10.3.4 Media *Citrat*.** Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara goresan. Kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru (Bonang dan Koeswandro 1982).

## **11. Pembuatan suspensi bakteri uji**

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dalam biakan murni pada media PSA, diambil 1 ose bakteri. Suspensi dipindahkan kedalam tabung reaksi yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) cair 10 ml, dihomogenkan kemudian

diinkubasi dan dibandingkan kekeruhan dengan standar Mc Farland setara dengan jumlah  $0,5 \times 10^8$  CFU/ml.

## **12. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif *n*-heksana, etil asetat, dan air**

Fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air yang diperoleh dari ekstrak etanol 70% daun bugenvil secara perkolasi diuji secara mikrobiologi dengan bakteri uji. Metode yang digunakan adalah metode dilusi dan difusi.

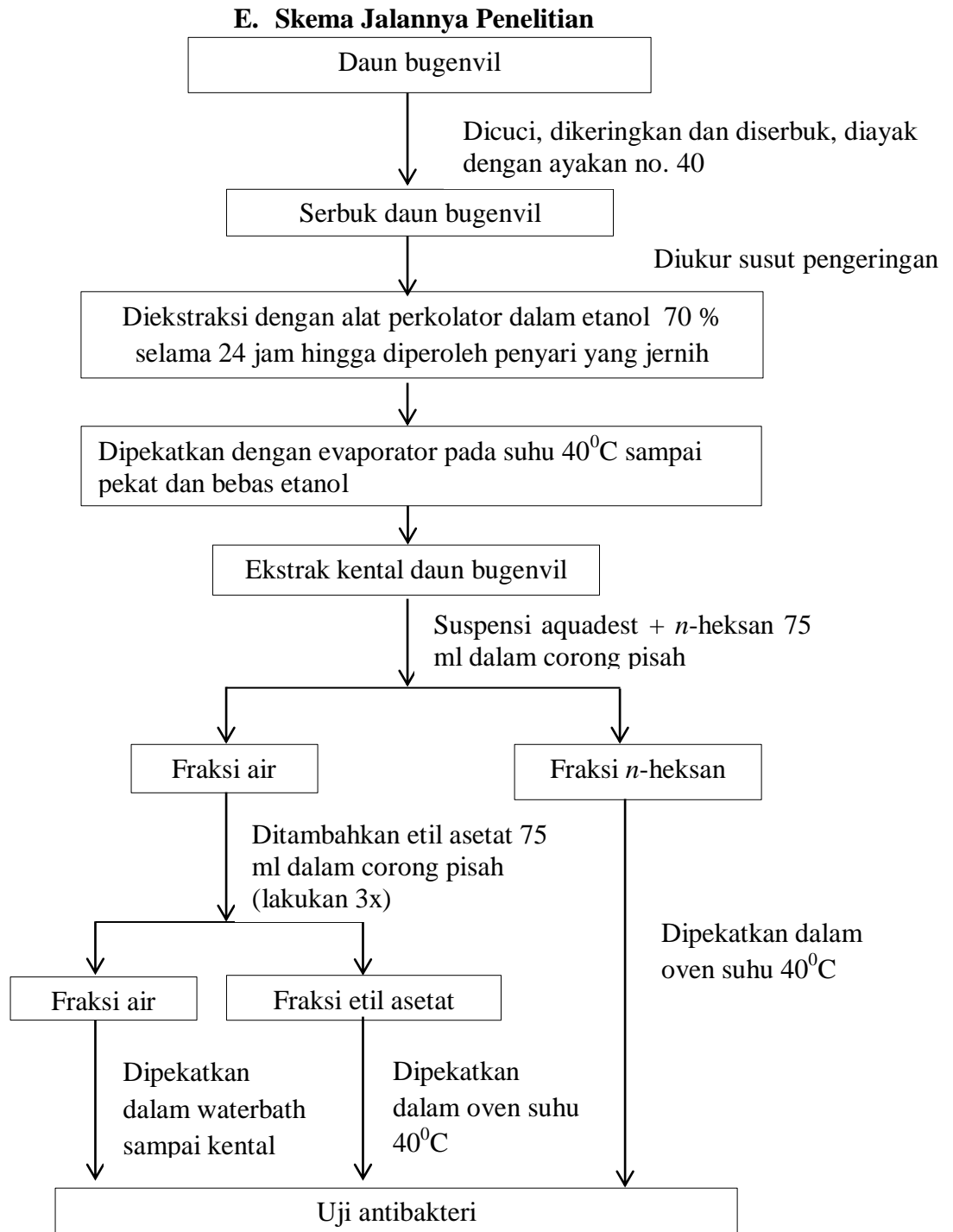
Metode difusi yang digunakan yaitu menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat kemudian diinokulasikan kedalam medium MHA dengan metode perataan (*Spread plate Method*) dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi kedalam media. Pada media tersebut dibuat 6 sumuran (5 mm) dengan jarak yang sama. Masing-masing sumuran diisi 5 $\mu$ l larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air, kotrimokasol sebagai kontrol positif dan DMSO 5 % sebagai kontrol negatif dengan menggunakan pipet droper, konsentrasi fraksi dalam tiap petri masing-masing 50%, 25% dan 12,5% . Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C dan diamati hasil dan diukur diameter zona hambat sekitar sumuran yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar sumuran menandakan bahwa kandungan kimia daun bugenvil memiliki daya hambat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 12 tabung steril. Masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa konsentrasi pengenceran yaitu 50%; 25%; 12,5 %; 6,2%; 3,1%; 1,5%; 0,7 %; 0,3 %; 0,1 %; 0,09%. Tabung pertama (kontrol negatif) hanya berisi fraksi etil asetat 1 ml, tabung ke-12 hanya berisi suspensi bakteri (kontrol positif). Tabung 2 berisi fraksi etil 0,5 mL, Tabung 3 berisi, fraksi etil 0,5 mL dan medium BHI 0,5 mL (medium BHI diisi dari 0,5 mL dari tabung 3-11) lalu tabung ke tiga dikocok kemudian diambil 0,5 mL dimasukan kedalam tabung 4, dari tabung 4 diambil 0,5 mL dimasukan kedalam tabung 5 dan begitu seterusnya sampai tabung kesebelas. Suspensi bakteri dalam medium BHI dimasukan kemudian 0,5 ml ke dalam masing-masing tabung uji

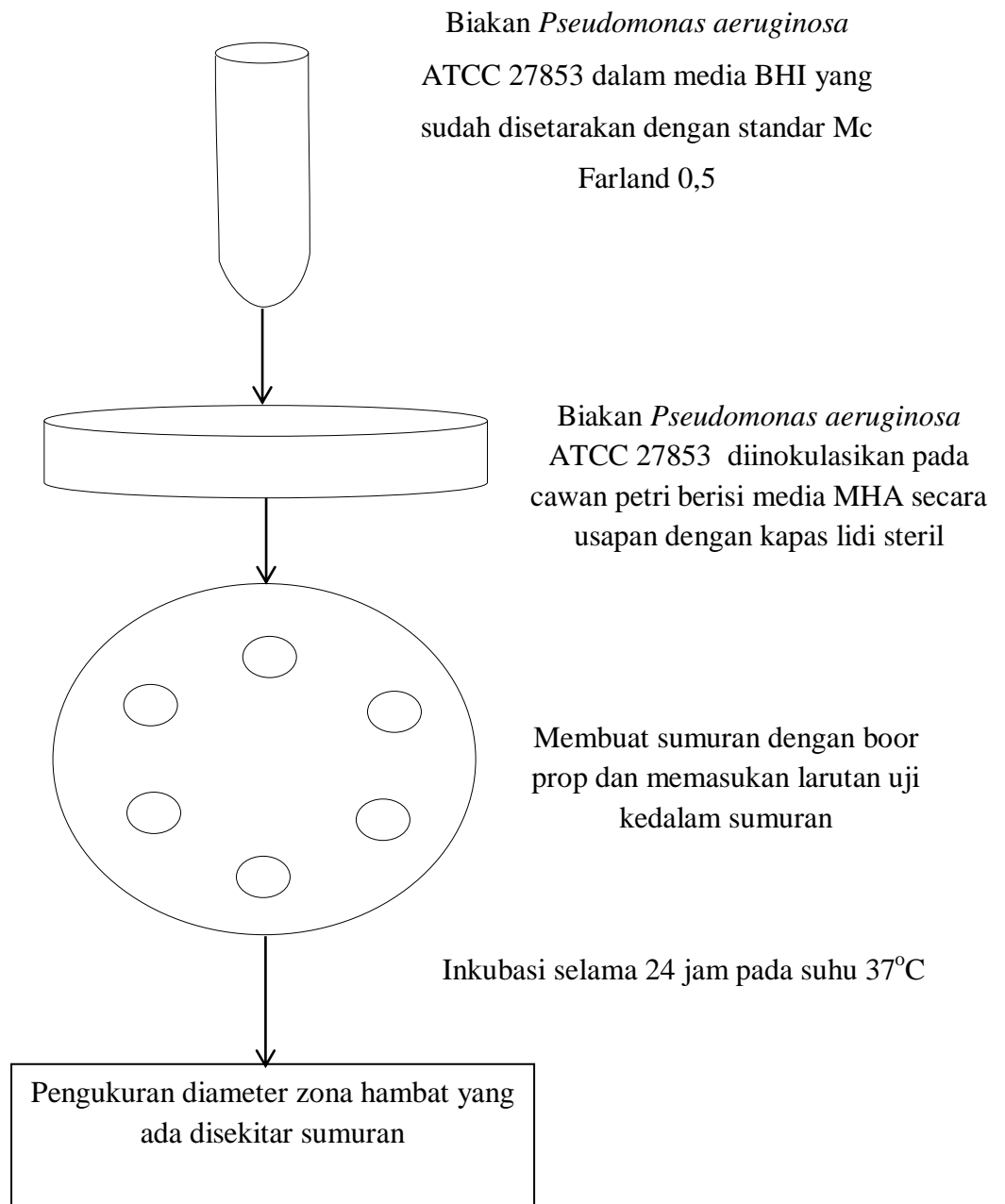
secara aseptis dari tabung 2-11. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) yaitu batas terendah tabung media yang jernih atau yang memberikan hasil negatif. Konsentrasi bunuh minimum (KBM) ditentukan dengan cara menginokulasi sediaan dari tabung uji pada media selektif, diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24-48 jam, mengamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri pada permukaan media selektif. Konsentrasi bunuh minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media PSA yang tidak menunjukkan adanya koloni bakteri yang tumbuh (Bonang dan Koeswandono 1982).

### **13. Analisis Hasil**

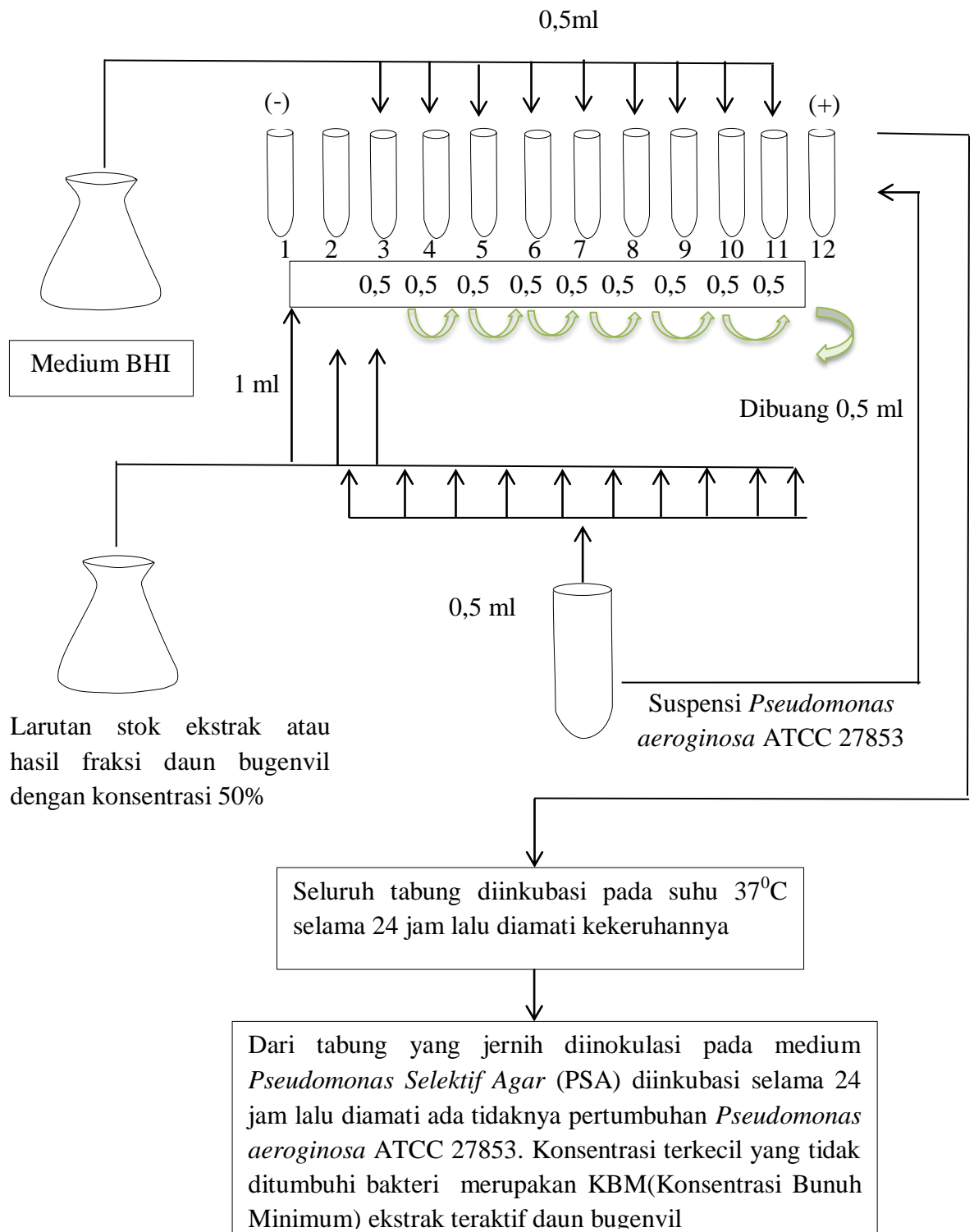
Hasil difusi ditentukan dengan nilai zona hambat yang terbentuk kemudian dianalisis menggunakan statistik anova satu jalan. Hasil uji dilusi ditentukan dengan kekeruhan pada tabung reaksi dan pertumbuhan bakteri pada media PSA.



**Gambar 1.** Skema pembuatan ekstrak etanolik dan fraksinasi daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*)



**Gambar 2.** Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun bugenvil terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode difusi



**Gambar 3.** Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun bugenvil terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode dilusi.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil Penelitian**

##### **1. Determinasi tanaman bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*)**

Determinasi dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari kemungkinan tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Determinasi dilakukan dibagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Berdasarkan hasil determinasi dinyatakan bahwa benar tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman bugenvil jenis *Bougainvillea spectabilis* suku *Nyctaginaceae*, dengan hasil determinasi sebagai berikut : 1a- 2b- 3b-4b-6b-7b-9a. golongan 4. 41b-42b-43b-54b-59b-60b. familia 42. Nyctaginaceae. 1a. Bougainvillea. 1. *Bougainvillea Spectabilis* Willd.

**1.2. Hasil deskripsi tanaman bugenvil.** Bugenvil termasuk tanaman liana yang kokoh, dengan duri ketiak yang menjauhi batang membengkok, panjang 5-15 meter. sistem akar tunggang, batang berkayu. Daun tersebar sampai berhadapan, bertangkai, bangun jorong, meruncing, tepi rata, pangkal tumpul. Bunga terususun dalam anak payung yang bertangkai, diketiak, berjumlah 1-7 anak payung, masing-masing anak payung terdiri dari tiga bunga; anak payung terkumpul mulai ujung yang berdaun. Daun pelindung duduk, bulat telur, bertulang daun, tidak rontok, merah, panjang 2,5-3,2 cm, lebar 1,5-1,8 cm; tenda bunga berbentuk tabung, berambut, tabung berusuk 5, bersegi 5, panjang 1,1-1,4 cm, merah, bagian bawah agak melembung. Benang sari 8, lk sama panjangnya dengan tabung. Tangkai putik lebih pendek. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

##### **2. Pembuatan serbuk daun bugenvil**

Daun bugenvil yang telah dikeringkan dan dihitung bobot kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada tabel 1. Hasil perhitungan bobot kering terhadap bobot basah daun bugenvil dapat dilihat pada lampiran 11.



**Tabel 1. Presentase bobot kering terhadap bobot basah daun bugenvil**

Bobot basah	Bobot kering	Rendemen
5000 gram	3000 gram	60%

Hasil dari bobot basah daun bugenvil 5 kg diperoleh bobot kering daun bugenvil 3 kg diperoleh persentase rendemen 60% . Daun bugenvil segar dan hasil kering dapat dilihat pada lampiran 2.

### 3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun bugenvil

Susut pengeringan adalah pengukuran sisa zat setelah pengeringan yang dinyatakan dalam nilai persen atau sampai berat konstan, yang dinyatakan sebagai nilai persen. Dalam hal khusus (jika bahan tidak mengandung minyak menguap dan sisa pelarut organik menguap) identik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena berada di atmosfer atau lingkungan udara terbuka.

Kadar air yang lebih dari 10 % yang terdapat dalam serbuk dapat mengaktifkan enzim-enzim dalam simplisia yang dapat berakibat rusak atau berubahnya komposisi kimia sehingga menurunkan kualitas pada simplisia tersebut. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun bugenvil dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun bugenvil dengan *Moisture Balance***

No	Bobot awal (gram)	Bobot akhir (gram)	Kadar susut pengeringan (%)
1	2,00	1,83	9,5
2	2,00	1,83	9,5
3	2,00	1,80	9,0
Rata-rata±SD			9,3 % ±0,28

Penetapan susut pengeringan pada penelitian ini menggunakan alat *Moisture Balance* dengan dengan suhu 110<sup>0</sup>C selama 30 menit atau sampai berat konstan dinyatakan dalam persen (Depkes 1995). Presentase rata-rata susut pengeringan serbuk daun bugenvil yang dilakukan dengan alat *Moisture Balance* yaitu 9,3 %.

Penetapan susut pengeringan tidak boleh lebih dari 10%. Susut pengeringan yang kurang dari 10% dapat mencegah pertumbuhan kapang dan aktivitas enzim sehingga bahan lebih awet dan kandungan zat aktifnya tidak berkurang (Depkes 1995). Berdasarkan dari penetapan susut pengeringan, dapat

dikatakan serbuk daun bugenvil ini memenuhi syarat karena persentase susut pengeringan serbuk daun bugenvil kurang dari 10%. Perhitungan penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada lampiran 12.

#### 4. Pembuatan ekstrak etanol daun bugenvil

Serbuk daun bugenvil diekstraksi dengan metode perkolasi dengan tujuan senyawa yang tidak tahan pemanasan ikut tersari. Ekstrak cair yang diperoleh dipisahkan dalam evaporator pada suhu 40°C. Hasil Pembuatan ekstrak etanol daun bugenvil dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil penetapan ekstrak daun bugenvil secara perkolasi**

Bahan serbuk (gram)	Bobot ekstrak kental (gram)	Rendemen ekstrak (% b/b)
800	70	8,75

Hasil tabel 3 ekstrak daun bugenvil diperoleh dari proses perkolasi menggunakan etanol 70% memiliki rendemen 8,75%. Organoleptis ekstrak warna hitam, konsistensi kental. Ekstrak difraksinasi menggunakan tiga pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air untuk mendapatkan senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 13.

#### 5. Uji bebas etanol ekstrak daun bugenvil

Ekstrak daun bugenvil dilakukan uji bebas etanol. Uji bebas etanol bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri dari ekstrak daun bugenvil. Hasil uji dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Hasil bebas etanol ekstrak perkolasi daun bugenvil**

Prosedur	Hasil	Pustaka
Ekstrak + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc + CH <sub>3</sub> COOH dipanaskan	Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol	Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol (Depkes 1997)

Hasil tes bebas etanol pada tabel 4 menunjukkan bahwa ekstrak daun bugenvil sudah terbebas dari pelarutnya yaitu etanol yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

## 6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi daun bugenvil

Identifikasi kandungan ekstrak daun bugenvil dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terkandung dalam daun bugenvil. Identifikasi pada senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan triterpenoid.

**Tabel 5. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun bugenvil**

Kandungan Kimia	Pustaka	Hasil dan Interpretasi data			
		Ekstrak	Fraksi		
			<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
Flavonoid	Warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harbone 2006).	Terbentuk warna kuning pada lapisan amil alkohol . (+)	Tidak terbentuk warna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol. (-)	Terbentuk warna kuning pada lapisan amil alkohol. (+)	tidak terbentuk warna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (-)
Alkaloid	Mayer: terbentuk endapan putih atau keruh. Dragendorf: endapan orange. Wagner: terbentuk endapan coklat (Depkes 1989).	Mayer: terbentuk endapan putih atau keruh. (+)	Dragendorf: tidak ada endapan. (-)	Dragendorf: endapan orange. (+)	Dragendorf :Berwarna hitam dan tidak ada endapan.(-)
Tanin	Reaksi positif bila berwarna biru kehitaman (Robinson 1995).	Berwarna biru kehitaman (+)	Berwarna hitam. (-)	Berwarna biru kehitaman. (+)	Berwarna biru kehitaman (+)
Saponin	Terdapat busa yang mantap + HCL buih tidak hilang (Depkes 1989).	Terbentuk buih yang mantap. (+)	Tidak ada buih yang terbentuk. (-)	Tidak ada buih yang terbentuk. (-)	Ada buih yang terbentuk. (+)
Triterpenoid	Terbentuknya warna merah kecoklatan atau ungu (Harbone 1987).	Terbentuk warna merah kecoklatan (+)	Terbentuk warna merah kecoklatan. (+)	Tidak terbentuk warna merah kecoklatan. (-)	Terbentuk warna hitam. (-)

Keterangan : (+) = mengandung golongan senyawa  
 (-) = tidak mengandung golongan senyawa

Hasil tabel 5 menunjukkan identifikasi kandungan kimia terhadap ekstrak dan fraksi daun bugenvil dengan menggunakan tabung reaksi dapat dilihat pada lampiran 4. Hasil penelitian mengenai kandungan kimia dalam ekstrak perkolasi dan fraksi daun bugenvil telah sesuai dengan pustaka, sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak perkolasi daun bugenvil mengandung flavonoid, saponin, tanin, alkaloid dan triterpenoid. Fraksi etil asetat terdapat kandungan senyawa flavonoid, alkaloid dan tanin.

## 7. Fraksinasi

Ekstrak yang didapat dari metode perkolasi kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan tiga pelarut berdasarkan polaritas. Pelarut nonpolar yang digunakan adalah *n*-heksana, pelarut semi polar etil asetat, dan sebagai pelarut polar adalah air untuk dilakukan fraksinasi.

**Tabel 6. Rendemen hasil fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan fraksi air daun bugenvil**

Fraksi	Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
<i>n</i> -heksana	10,00	0,90	9,00%
etil asetat		1,56	15,6%
air		5,22	52,2%
<i>n</i> -heksana	10,01	0,90	9,99%
Etil asetat		1,60	15,98%
air		5,31	53,04%
<i>n</i> -heksana	10,02	0,97	9,68%
etil asetat		1,70	16,96%
air		5,30	52,89%

Keterangan: Rata-rata rendemen fraksi *n*-heksana  $9,2\% \pm SD 0,39$ , rata-rata rendemen fraksi etil asetat  $16,8\% \pm SD 0,70$ , rata-rata rendemen fraksi air  $52,71\% \pm SD 0,44$ .

**7.1. Fraksi *n*-heksana.** Organoleptis fraksi *n*-heksana berwarna hitam, konsistensi kental, tidak berbau. Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat bahwa perhitungan rata-rata persentase rendemen fraksinasi *n*-heksana yang didapat dari replikasi pertama, kedua dan ketiga lebih kecil dari fraksi etil asetat dan fraksi air disebabkan senyawa yang bersifat nonpolar pada simplisia sedikit. Perhitungan rata-rata persen rendemen fraksi *n*-heksana kecil disebabkan pada saat dilarutkan ekstrak etanol daun bugenvil tidak terlarut dengan sempurna. Gambar fraksi *n*-

heksana dan perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana dapat dilihat pada lampiran 3 dan 13.

**7.2. Fraksi etil asetat.** Organoleptis fraksi etil asetat warna hitam kehijauan, konsistensi kental, tidak berbau. . Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat perhitungan rata-rata persentase rendemen fraksi etil asetat replikasi pertama, kedua dan ketiga memiliki presentase rendemen lebih besar dibandingkan fraksi *n*-heksana disebabkan senyawa yang bersifat semi polar lebih banyak dari pada senyawa non polar. Gambar fraksi etil asetat dan perhitungan rendemen daun bugenvil dapat dilihat pada lampiran 3 dan 13.

**7.3. Fraksi air.** Organoleptis fraksi air warna hitam konsistensi kental, tidak berbau. Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat bahwa perhitungan rata-rata persentase rendemen fraksi air replikasi pertama, kedua dan ketiga memiliki perhitungan persentase rendemen yang lebih banyak dibandingkan fraksi *n*-heksana dan etil asetat karena sebagian besar senyawa dalam daun bugenvil yang bersifat polar lebih banyak, sehingga nilai berat fraksi air paling besar. Gambar fraksi air dan perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 3 dan lampiran 13.

## **8. Identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

**8.1. Identifikasi dengan penggoresan pada media PSA.** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasikan pada media *Pseudomonas Selektive Agar* (PSA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Berdasarkan pengamatan, koloni yang dihasilkan berbentuk bulat, halus dan berwarna hijau kebiruan hal ini karena bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menghasilkan pigmen pyocyanin (Jawetz *et al* 2007). Foto hasil inokulasi dapat dilihat pada lampiran 5.

**8.2. Identifikasi dengan pewarnaan Gram.** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang. Pewarnaan Gram berguna untuk dapat meyakinkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan bakteri Gram negatif. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat preparat ulasan (smear) yang difiksasi kemudian ditetesi kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, didiamkan selama kurang lebih 1 menit, kemudian dicuci dengan akuadest

mengalir. Ditetesi mordant (*lugol's iodine* / Gram B), didiamkan selama kurang lebih 1 menit, kemudian dicuci kembali dengan akuadest mengalir dan dikering anginkan. Preparat dilunturkan dengan Gram C (alkohol) sampai alkohol yang jatuh berwarna jernih, lalu dicuci dengan aquadest mengalir. Preparat ditetesi dengan Gram D (safranin) dan ditunggu selama 45 detik, kemudian preparat dicuci dengan aquadest mengalir, dikeringkan dengan kertas tisu yang ditempelkan disisi ulasan lalu didiamkan sampai mengering diudara dan diamati dibawah mikroskop (Jawetz *et al* 2012). Hasil pengecatan Gram dapat dilihat di lampiran 5.

**8.3. Identifikasi dengan uji biokimia.** Hasil identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara biokimia dapat dilihat pada tabel 9.

**Tabel 7. Hasil identifikasi dengan uji biokimia**

Media uji	Hasil	Pustaka (Bonang dan Koeswandoro 1982)
SIM	-- +	-- +
KIA	K/KS <sup>-</sup>	K/KS <sup>-</sup>
LIA	K/KS <sup>-</sup>	K/KS <sup>-</sup>
Citrat	+	+

Keterangan :

SIM = Sulfida Indol Motility

KIA = Kliger Iron Agar

LIA = Lysin Iron Agar

+ = Reaksi positif

- = Reaksi negatif

A= Acid (asam)

K= Alkali (basa)

S= Sulfida

G= Gas

N= Netral

Hasil pengujian pada SIM untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas. Uji sulfida (-) karena tidak dapat mereduksi thiosulfate sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfat menyebabkan media tidak berwarna hitam. Uji Indol (-) karena tidak terbentuk cincin merah pada media setelah ditambah reagen Erlich A dan B 3 tetes ini berarti uji indol negatif, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tidak membentuk cincin indol karena tidak terjadi pemecahan asam amino triptopan oleh enzim triptonase menjadi indol & asam piruvat sehingga menunjukkan bakteri tidak memakai triptopan sebagai salah satu sumber karbon sehingga tidak terjadi reaksi antara indol dan parametil amino bensaldehid yang akan membentuk rosindol yang berwarna merah. Uji motilitas (+) karena terjadi pertumbuhan bakteri disekitar bekas tusukan, hal ini

menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagel.

Hasil uji pada medium KIA untuk mengetahui fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Hasil yang diperoleh menunjukkan K/KS<sup>-</sup>, K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna merah, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak memfermentasi glukosa dan laktosa, S(-) artinya H<sub>2</sub>S negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media, karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H<sub>2</sub>S dan H<sub>2</sub>S akan bereaksi dengan Fe<sup>++</sup> yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam. Medium KIA mengandung laktosa dan glukosa dalam konsentrasi 1% laktosa, 0,1% glukosa dan phenol red sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam. Medium KIA juga mengandung sodium thiosulfate yaitu susunan untuk penghasil H<sub>2</sub>S.

Medium LIA untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfide. Pengujian dengan LIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C menunjukkan hasil K/KS<sup>-</sup>, K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekaboksilasi lisin menyebabkan reaksi basa (warna ungu) diseluruh media karena warna pembenihan ini mengandung bromkresol ungu dari warna coklat menjadi warna ungu, S(-) artinya uji H<sub>2</sub>S negative ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H<sub>2</sub>S dan H<sub>2</sub>S akan bereaksi dengan Fe<sup>++</sup> yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam.

Hasil pengujian pada medium citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Hasil menunjukkan positif ditandai dengan adanya warna biru pada media citrat. Hal ini karena *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mampu menggunakan citrat sebagai sumber karbon maka menyebabkan suasana menjadi basa sehingga terjadi peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru karena pada medium citrate terdapat indikator BTB (*Bromo thymol blue*) yang

merupakan indikator pH. Hasil uji identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat pada lampiran 5.

### 9. Pembuatan suspensi bakteri uji

1 ose bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dalam biakan murni pada medium PSA, dipindahkan kedalam tabung reaksi yang berisi medium *Brain Heart Infusion* (BHI) cair 10 ml. Dihomogenkan. Inkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam dan dibandingkan kekeruhan dengan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah 0,5 X 10<sup>8</sup> CFU/mL.

### 10. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi menggunakan metode difusi. Metode ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat zona radikal disekitar sumuran yang dinyatakan dalam mm, daerah yang jernih di sekitar sumuran menandakan bahwa kandungan kimia daun bugenvil memiliki daya bunuh terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**Tabel 8. Hasil uji aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 metode difusi**

Konsentrasi	Sampel	Diameter Hambat (mm)			Rata-rata(mm) ±SD
		Replikasi			
		1	2	3	
50%	<i>n</i> -heksana	16	14	14	14,66± 1,15
	etil asetat	18	17	18	17,66± 0,57
	air	10	9	9	9,33± 0,57
	Ekstrak	14	13	13	13,33± 0,57
25%	<i>n</i> -heksana	14	13	13	13,33± 0,57
	etil asetat	16	17	15	16± 1
	air	9	8	9	8,66± 0,57
	ekstrak	13	12	13	12,66± 0,57
12,5%	<i>n</i> -heksana	11	11	12	11,33± 0,57
	etil asetat	16	16	15	15,66± 0,57
	air	7	7	6	6,66± 0,57
	ekstrak	10	11	10	10,33± 0,57
Kontrol (+)		20	19	20	19,66± 0,57
Kontrol (-)		0	0	0	0

Hasil uji difusi menunjukkan bahwa ekstrak dengan konsentrasi 50 % memiliki diameter daya hambat yang lebih besar dari konsentrasi 25% dan 12,5 %. Berdasarkan tabel 8 hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat



merupakan fraksi yang memiliki diameter daya hambat terbesar dalam menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dibandingkan dengan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Hasil rata-rata diameter daya hambat fraksi etil asetat dengan masing-masing konsentrasi yaitu 50%, 25%, dan 12,5% adalah 17,6 mm, 16 mm, 15 mm.

Kontrol positif (kotrimoksazol) terbukti efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan diameter daya hambat rata-rata paling besar dibandingkan dengan fraksi teraktif (fraksi etil asetat 50%) yaitu sebesar 19,6 mm. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi menggunakan kontrol negatif DMSO 5% yang dalam pengujian ini tidak aktif dalam menghambat bakteri uji.

Hasil dari uji difusi dari tabel diatas diuji kebenarannya menggunakan uji SPSS *one way anova*. Uji ini digunakan untuk membandingkan sampel pada tiap konsentrasi. Data yang dianalisis dengan *one way anova* adalah konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan antibiotik kotrimoksazol. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara fraksi *n*-heksana, etil asetat air, ekstrak etanol, kontrol positif dan kontrol negatif guna mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan signifikan.

Hasil uji *One-Sampel Kormogorov Sminorv* menunjukkan bahwa nilai signifikansinya sebesar  $0,886 > 0,05$  maka  $H_0$  diterima artinya data yang diuji terdistribusi normal. Berdasarkan uji tersebut data terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan *Analysis of Varians* (ANOVA). Hasil uji anova pada tabel diameter hambat didapatkan hasil  $F=81,683$  dengan probabilitas  $0,000 < 0,05$  yang berarti sediaan uji tersebut menunjukkan adanya perbedaan nyata pada penghambatan aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Berdasarkan tabel *tukey test* menunjukkan tanda (\*) pada angka *mean difference*, artinya hasil diameter hambat fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan ekstrak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Analisis *homogeneous subsets* ini untuk mencari grup/subset mana saja yang mempunyai perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *homogeneous* terbagi dalam 8 subset., Subset 1 terdapat fraksi air 12,5 % dan 25% . Subset 2 sampai 7 terdapat

sediaan uji dengan konsentrasi yang berbeda-beda pula. Subset 7 terdapat fraksi etil asetat 12,5 %, 25% dan 50% sehingga diketahui bahwa fraksi etil asetat 50% merupakan fraksi paling aktif, diameter daya hambat konsentrasi 50% lebih besar dibandingkan 12,5% dan 25 % hal ini dikarenakan etil asetat 50% lebih banyak mengandung zat aktif yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Subset 8 terdapat fraksi etil asetat 50% dan antibiotik kotrimoksazol, dari berbagai subset diketahui bahwa subset 1-8 mempunyai beda nyata dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Hal ini berbeda dengan sediaan uji yang termasuk dalam satu subset tidak mempunyai beda nyata secara signifikan dalam penghambatan aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat dilampiran 17.

Fraksi etil setat memiliki zona hambat yang paling besar dibandingkan fraksi *n*-heksana dan fraksi air karena sifat etil asetat yang semi polar. Fraksi etil mengandung senyawa kimia yang lebih kompleks dibandingkan pada fraksi polar dan non polar oleh sebab itu fraksi etil asetat lebih banyak menarik senyawa antibakteri yakni flavonoid, alkaloid dan tanin hal tersebut mengakibatkan fraksi etil asetat menjadi fraksi teraktif dengan membentuk daya hambat paling besar dibandingkan fraksi *n*-heksana dan fraksi air.

#### **11. Pengujian antibakteri fraksi teraktif daun bugenvil secara dilusi**

Pengujian aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan metode dilusi dari fraksi teraktif etil asetat untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan konsentrasi 50%, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,12%. 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,1 %, 0,09%. kontrol (+) dan kontrol (-).

Aktivitas antibakteri dapat diketahui dari kekeruhan pada tabung reaksi lalu kemudian digoreskan pada media agar. Hasil menunjukkan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) susah diamati karena fraksi etil asetat yang digunakan keruh, sehingga dilanjutkan dengan penggoresan pada media PSA. Metode dilusi bermanfaat untuk mengetahui dosis minimal dari obat yang bersifat antibakterial. Konsentrasi Bunuh Minimum ditentukan pada medium PSA dengan konsentrasi

paling terkecil yang tidak menunjukkan pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Berdasarkan tabel 9 bawah terlihat bahwa fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 3,12%. Hal ini dapat disebabkan karena senyawa antibakteri yang terkandung dalam daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) bersifat semi polar sehingga terlarut pada fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat dapat melarutkan senyawa flavonoid, alkaloid dan tanin yang diduga efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**Tabel 9. Hasil aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak daun bugenvil terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara dilusi**

Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat		
	I	II	III
kontrol (+)	+	+	+
50%	-	-	-
25%	-	-	-
12,5%	-	-	-
6,25%	-	-	-
3,12%	-	-	-
1,56%	+	+	+
0,78%	+	+	+
0,39%	+	+	+
0,1 %	+	+	+
0,09 %	+	+	+
kontrol (-)	-	-	-

Keterangan :

(+): ada pertumbuhan bakteri

(-) : tidak ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-): fraksi etil

Kontrol (+) : suspensi bakteri

Mekanisme flavonoid mempunyai mekanisme kerja sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat dari sel bakteri, menghambat fungsi dari membran sitoplasma, dan flavonoid juga dapat mengganggu metabolisme energi yang dibutuhkan oleh bakteri sehingga pertumbuhan bakteri terhambat (Ajizah 2004). Alkaloid memiliki mekanisme penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel bakteri (Ajizah 2004). Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan

dengan kemampuan untuk menginaktivasi adhesin sel mikroba juga menginaktivasi enzim dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Ajizah 2004).

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dari daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada konsentrasi 50% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 17,6 mm.

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sebesar 3,12%.

#### **B. Saran**

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) secara *in vivo*.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*) dengan menggunakan pelarut dan metode yang lain.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella Typhimurium* terhadap ekstrak daun *Psidium guajava* L. *Jurnal Biologi pertanian* 1: 31-8
- Anief M. 2003. *Ilmu Meracik Obat, Teori dan Praktek*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press. Hal 168-169
- Bonang G dan Koeswardono. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: PT Gramedia
- [Departemen Kesehatan RI]. 1986. *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. Hlm 4-11, 25-26
- [Departemen Kesehatan RI]. 1989. *Materia Medika*. Jilid VI. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dwijoseputro. 1978. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta : Djambatan
- Dwiprahasto I., 2005. Kebijakan Penggunaan Antibiotika Profilaksi Untuk Mencegah Infeksi Luka Operasi di Rumah Sakit. *Jurnal Manajemen Pelayanan Kesehatan*. Vol.08 no. 04:177-180
- Ganiswara. S. E. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi IV. Jakarta; Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Gilman E. F.1999. *Bougainvillea spp.* Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Science. University of Florida. Hlm 1-3
- Goodman and Gilman. 2007. *Manual Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: EGC
- Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam*. Jilid 1. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hajare CN, Inamdar FR, Patil RV, Shete CS, Wadkar SS, Patil KS, Gosh JS. 2015. Antibacterial Activity of the Leaves of *Bougainvillea spectabilis* Against *E. coli* NCIM 2832 and *M. aureus* NCIM 5021. Departement of Biotechnology, Smt.K.W. College, Sangli, India. Hlm 194-196
- Harbone JB. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun dan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Kokasih P, Iwang S. Penerjemah; Sofia N, Editor. Bandung; ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*. Hlm 155-157
- Harbone JB. 2006. *Metode Fitokimia*. Edisi ke-2. Kokasih padwinata dan Iwang Soediro, Penerjemah; Bandung : ITB Press. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.

- Harminta, RM. 2004. *Analisis Hayati*. Jakarta: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Istiantoro, Y.H dan Gan. V.G.H. 2007. *Penisilin, Sepalosporin, dan Antibiotik Betalaktam Lainnya Dalam Farmakologi dan Terapi*. Edisi kelima. Editor Sulistia G. Ganiswara. Jakarta. Hlm 643.
- Jawetz, E. Melnick JL., dan Adelberg, E. A., 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Edisi XVII. 368-384.
- Jawetz, E. Melnick, JL., dan Adelberg, E. A., 2007. *Medical Microbiology*. 23 th Ed. Elferia NR, Penerjemah: Jakarta. Hlm 170,225-228,266-270
- Jawetz, E. Melnick, JL., dan Adelberg, E. A., 2012. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 25*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Katzung, Bertram G. 2010. *Farmakologi Dasar dan Klinik* (terjemahan) . Ed.10. penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kobayashi, KD., McConnell J., Griffis J. 2007. *Ornamentals and Flower: Bougainvillea*. Department of Tropical plant and soil science. University of Guam. Hlm 1-3
- Kurniawati A.D. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak, Fraksi *n*-Heksan, Etil Asetat dan Air Dari Kulit Buah Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Dengan Metode Dilusi.[Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
- List P. H., P. C. Schmidt. 2000. *Phytopharmacals Technology*. Alih bahasa: David Ellaby. Florida: CRC Press. Hal.67, 71-73
- Markham., KM., 1988. *Techniques of Flavonoid Identification.*, diterjemahkan oleh Kokasih Padmawitanata. ITB . Bandung. Hlm 154
- Mayasari. 2005. *Karakteristik, Infeksi dan Penanganan*. Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Murhadi, Kuntaman, Warsito, Mertaniasih, Harsono, dan Alimsardjono, 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, Salemba Medika, Surabaya, Terjemahan : Mc Graw Hill Book Company. Hlm 318-320
- [NPGS] National Plant Germplasm System. 2004. Taxon: *Bougainvillea spectabilis* Willd.  
<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail>[1 Nov 2016]
- Pratiwi T.S, 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, Erlangga, Jakarta. Hlm 115

- Radji, M. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Rashid F, Sharif N, Ali I, Sharif S, Nisa F U, Nas S.2013.*Phytochemical analysis and inhibitory activity of Ornamental Plant(Bougainvillea spectabilis)*. Asian Journal of plant and Research.1-5.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. edisi VI. Kokasih,Padma Winata,penerjemah ; bandung : institute bandung Press
- Rukmana, R., 1995. Bugenvil Seri Tanaman Hias, Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Setiabudy, Rianto. 2007. *Farmakologi dan Terapi* Edisi V (cetak ulang dengan perbaikan). Jakarta: Gaya Baru.
- Soleha, M., Elvistra, H. L., Fitri, N. & Triyani., 2009, Pola Resistensi Bakteri terhadap Antimikroba di Jakarta, *Proceeding Puslitbang Biomedis dan Farmasi, Badan Litbang Kesehatan, Jakarta*.
- Suriawiria, U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Tapas Sinar Sinanti
- Suriawiria,U.1986, *Pengantar Mikrobiologi Umum* , Penerbit Angkasa, Bandung
- Suryono, B. 1995. *Bakteriologi Umum dan Bakteriologi Klinik*. Akademi Analis Kesehatan Bhakti Wijaya Kediri. Hlm 18, 45-50
- Umamaheswari A, Shreevidya R, Nuni A. 2008. *In vitro* Antibacterial Activity of *Bougainvillea spectabilis* Leaves Extracts. *Advances in Biological Research* 2. Hlm 1-2.
- [USDA] Unite State Departement of Agriculture. 2016. Plant Profile for *Bougainvillea spectabilis* Willd.  
<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=BOSP6>[1 nov 2016]
- Voigt R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Sediaan Farmasi*. Ed ke-5. Noerono S, Penerjemah; Yogyakarta: Gajah Mada University press. Terjemahan dari: *Lehrbuch Der Pharmazeutiches Technologi*. Hlm 95-100
- Wijayakusuma H, Wirian AS,Dalimarta S. 1992. *Tanaman Berkhasiat Obat Indonesia*. Jilid II. Jakarta : Pustaka Rini.



L

A

M

P

I

R

A

N

## Lampiran 1. Determinasi tanaman bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*)



### UPT- LABORATORIUM

No : 181/DET/UPT-LAB/03/V/2017  
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Brigita Maria Febrina Asuk  
NIM : 19133985 A  
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Bougainville** (*Bougainvillea spectabilis* Willd.)

Hasil determinasi berdasarkan : Steenis: FLORA

1a – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9a. golongan 4. 41b – 42b – 43b – 54b – 59b – 60b. familia 42.

Nyctaginaceae. 1a. Bougainvillea. 1. *Bougainvillea spectabilis* Willd.

Deskripsi :

Habitus : Liana yang kokoh dengan duri ketiak yang menjauhi batang membengkok, panjang 5 – 15 meter.

Akar : Sistem akar tunggang.

Batang : Berkayu.

**Daun : Daun tersebar sampai berhadapan, bertangkai, bangun jorong, meruncing, tepi rata, pangkal tumpul.**

Bunga : Bunga tersusun dalam anak payung yang bertangkai, di ketiak, berjumlah 1 – 7 anak payung, masing-masing anak payung terdiri dari tiga bunga; anakpayung terkumpul malai ujung yang berdaun. Daun pelindung duduk, bulat telur, bertulang daun, tidak rontok, merah, panjang 2,5 – 3,2 cm, lebar 1,5 – 1,8 cm; tenda bunga bentuk tabung, berambut; tabung berusuk 5, bersegi 5, panjang 1,1 – 1,4 cm, merah, bagian bawah agak melembung. Benang sari 8, lk sama panjangnya dengan tabung. Tangkai putik lebih pendek.

Pustaka : Steenis C.G.G.J., Bloembergen S. Eyma P.J. (1978): *FLORA*, PT Pradnya Paramita. Jl. Kebon Sirih 46. Jakarta Pusat, 1978.

Surakarta, 03 Mei 2017

Konfirmasi determinasi

Dra. Kartinah Wirjosoendjojo, SU.

**Lampiran 2. Gambar daun bugenvil dan serbuk daun bugenvil**

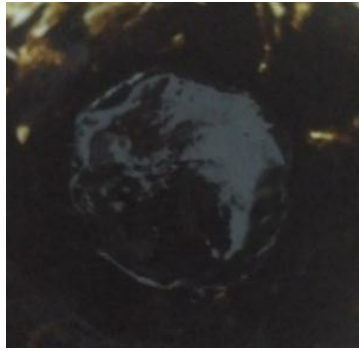


Daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*)



Serbuk daun bugenvil

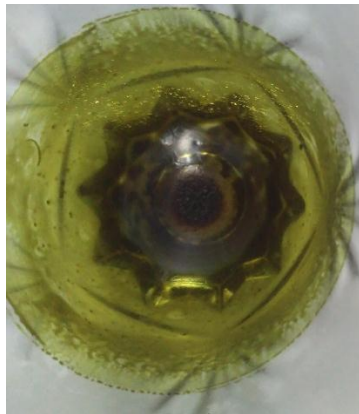
**Lampiran 3. Foto ekstrak daun bugenvil, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air**



Ekstrak daun bugenvil



fraksi *n*-heksana

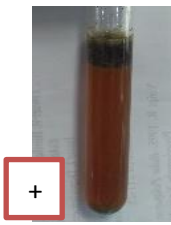



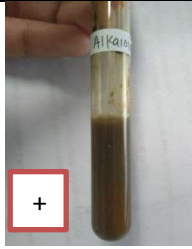





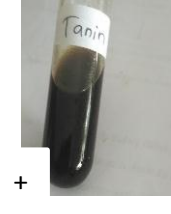





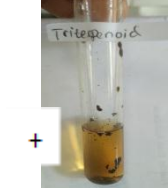





Fraksi etil asetat



fraksi air

**Lampiran 4. Foto identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air**

Senyawa	Bahan uji			
	Ekstrak	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
<b>Flavonoid</b>	 +	 -	 +	 -
<b>Alkaloid</b>	 +	 -	 +	 -
<b>Tanin</b>	 +	 -	 +	 +
<b>Saponin</b>	 +	 -	 -	 +
<b>Triterpenoid</b>	 +	 +	 -	 -

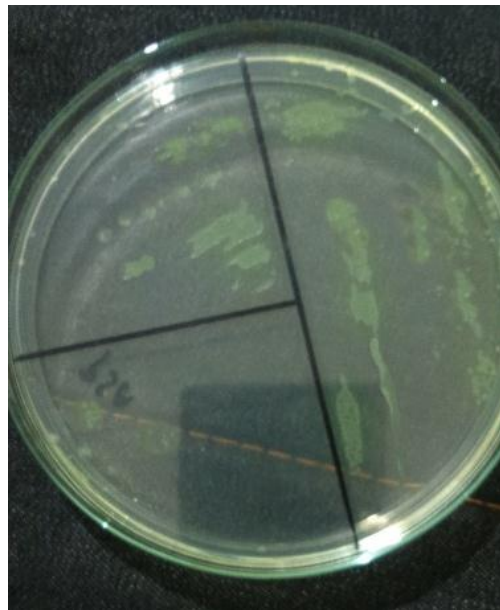
Keterangan : (+) = ada kandungan senyawa

(-) = tidak ada kandungan senyawa

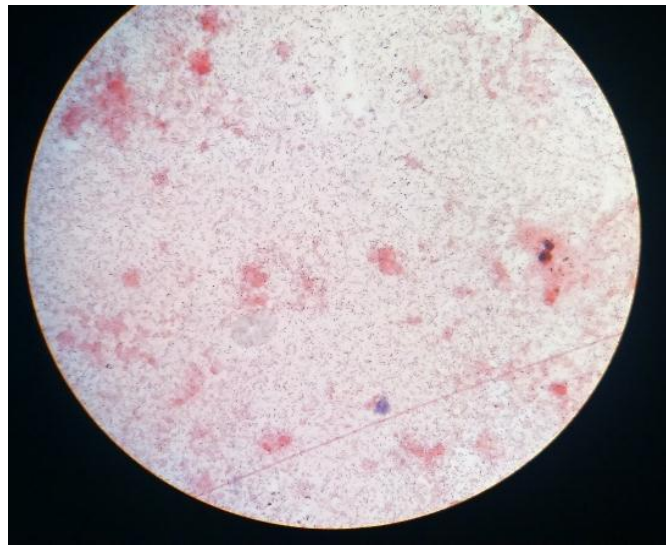
**Lampiran 5. Foto suspensi bakteri uji dan hasil identifikasi bakteri uji  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**



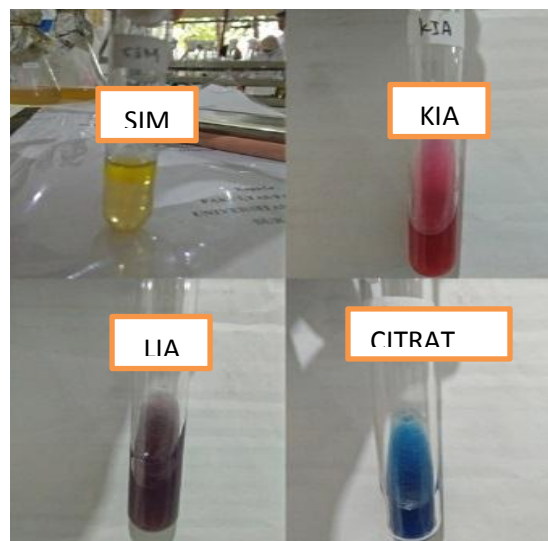
Keterangan : Suspensi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan standar Mc Farland



Keterangan: Hasil identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 berdasarkan koloni pada media PSA (*Pseudomonas* Selektif Agar)



Keterangan : Hasil identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 berdasarkan pewarnaan Gram



Keterangan : Hasil identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan uji biokimia

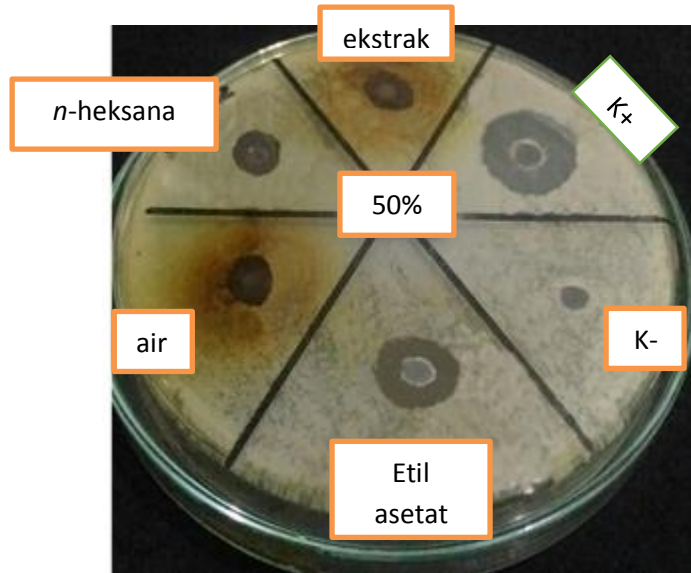
**Lampiran 6. Foto pengenceran ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air**



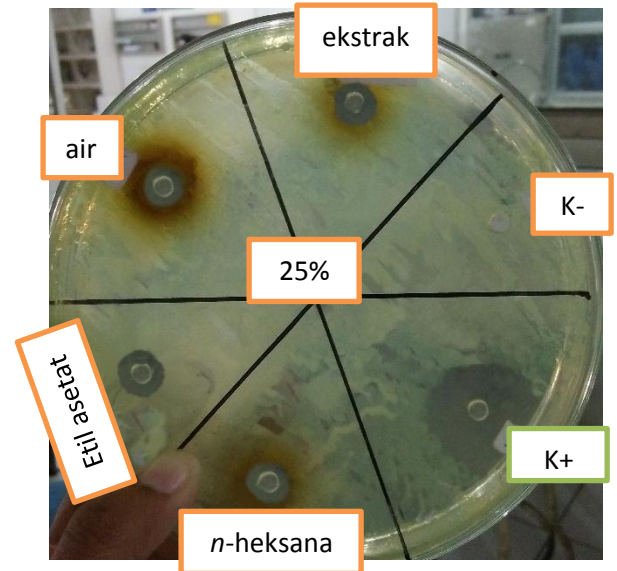
Keterangan : Foto pengenceran difusi dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air konsentrasi 50 %, 25%, 12,5%



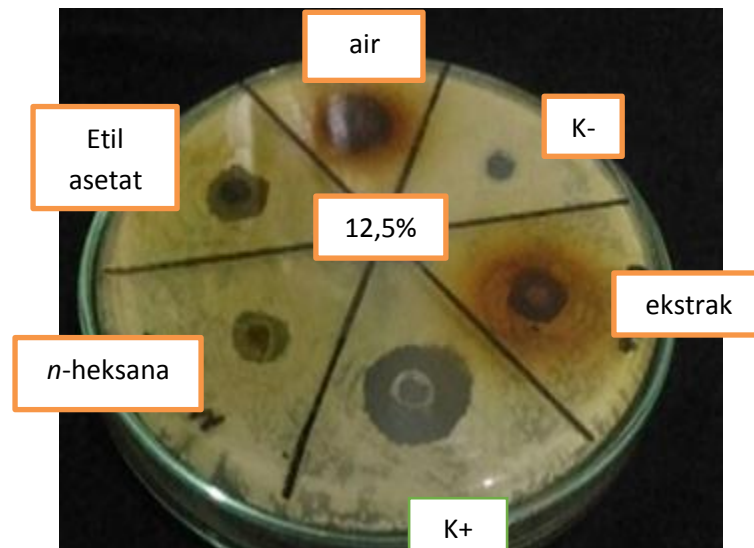
Lampiran 7. Foto hasil uji difusi fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Konsentrasi 50%

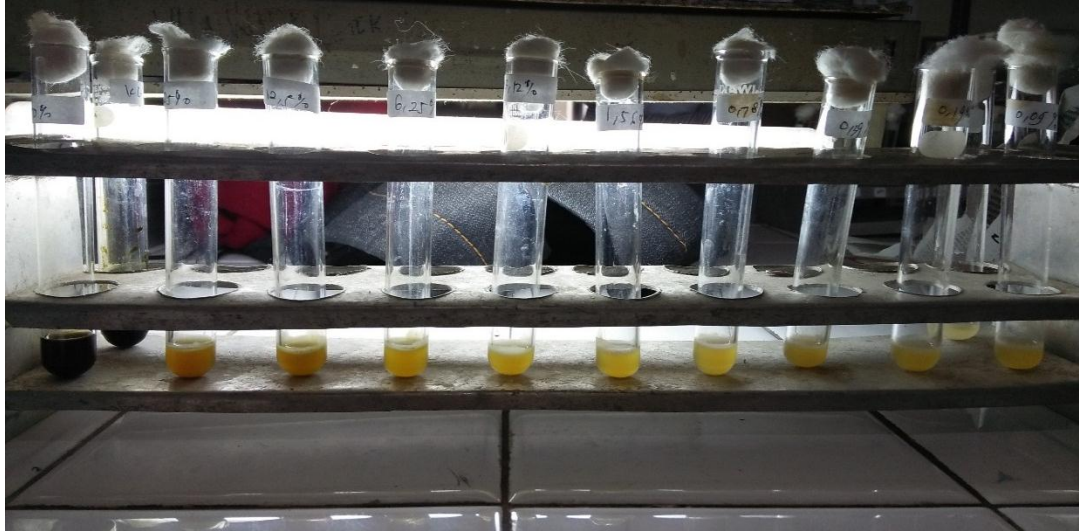


Konsentrasi 25 %

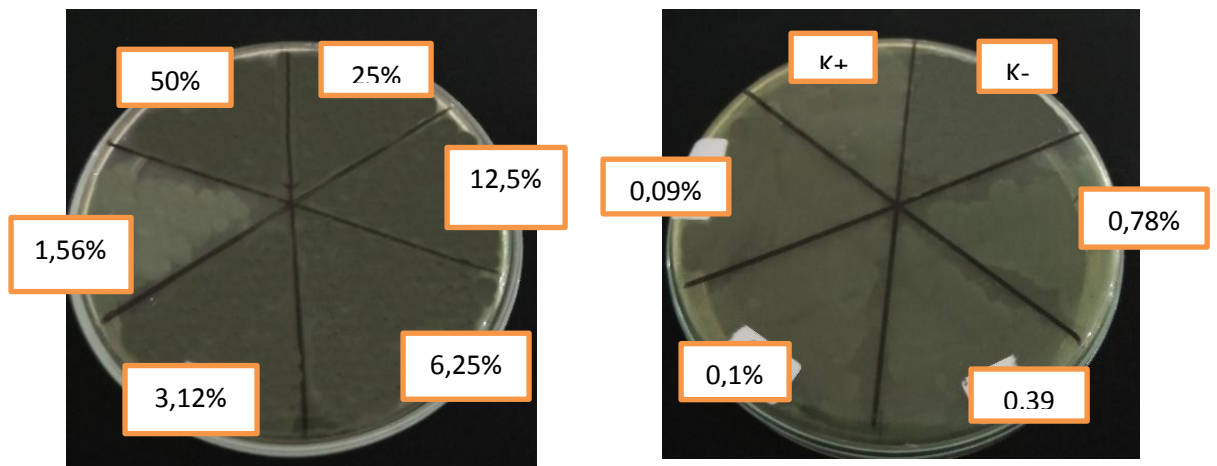


Konsentrasi 12,5 %

**Lampiran 8. Foto hasil uji dilusi fraksi teraktif etil asetat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**



Keterangan: pengenceran dilusi fraksi teraktif etil asetat konsentrasi 50%



Keterangan : Hasil inokulasi dari fraksi teraktif etil asetat pada media PSA  
(*Pseudomonas Selektif Agar*)

**Lampiran 9. Foto alat *Moisture balance*, perkolator, evaporator dan corong pisah**



*Moisture balance*



Perkolator



Evaporator



Corong pisah

**Lampiran 10. Foto alat timbangan, oven, autoklaf, inkas, inkubator dan vortex.**



Timbangan



Oven



Autoklaf



Inkas



Inkubator



Vortex

**Lampiran 11. Perhitungan peesentase bobot kering terhadap bobot basah daun bugenvil**

Bobot basah	Bobot kering	Rendemen
5000 gram	3000 gram	60%

$$\begin{aligned} \text{Rendemen serbuk} &= \frac{\text{bobot kering (g)}}{\text{bobot basah (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{3000 \text{ (g)}}{5000 \text{ (g)}} \times 100\% \\ &= 60 \% \end{aligned}$$

**Lampiran 12. Perhitungan penetapan susut pengeringan menggunakan alat *Moisture balance***

No	Bobot awal (gram)	Bobot akhir (gram)	Kadar susut pengeringan (%)
1	2	1,83	9,5
2	2	1,83	9,5
3	2	1,80	9.0
Rata-rata			9,3%

Perhitungan penetapan susut pengeringan serbuk daun bugenvil:

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata} &= \frac{9,5 \% + 9,5 \% + 9,0 \%}{3} \\ &= 9,3 \% \end{aligned}$$

**Lampiran 13. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air**

Bobot serbuk(gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
800 gram	70 gram	8,75

$$\begin{aligned} \text{Rendemen ekstrak \%} &= \frac{\text{bobot ekstrak kental (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{70 \text{ (g)}}{800 \text{ (g)}} \times 100\% \\ &= 8,75\% \end{aligned}$$

**Rendemen fraksi *n*-heksana daun bugenvil**

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen <i>n</i> -heksana %
10,00	0,90	9
10,01	0,90	8,99
10,02	0,97	9,68
Rata-rata		9,2%

Perhitungan rendemen *n*-heksana :

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen fraksi } n\text{-heksana 1} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{0,83 \text{ gram}}{10,00 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 9 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen fraksi } n\text{-heksana 2} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{0,90 \text{ gram}}{10,01 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 8,99 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Rendemen fraksi } n\text{-heksana 3} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,97 \text{ gram}}{10,02 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 9,68 \%
 \end{aligned}$$

#### Rendemen fraksi etil asetat daun bugenvil

Bobot ekstrak(gram)	Bobot fraksi(gram)	Rendemen fraksi etil asetat %
10,00	1,56	15,6
10,01	1,60	15,98
10,02	1,70	16,96
Rata-rata		16,18

Perhitungan rendemen etil asetat :

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Rendemen fraksi etil asetat 1} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{1,56 \text{ gram}}{10,00 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 15,6 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Rendemen fraksi etil asetat 2} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{1,60 \text{ gram}}{10,01 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 15,98\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Rendemen fraksi etil asetat 3} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{1,70 \text{ gram}}{10,02 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 16,96\%
 \end{aligned}$$

### Rendemen hasil fraksinasi air daun bugenvil

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen fraksi etil asetat %
10,00	5,22	52,2
10,01	5,31	53,04
10,02	5,30	52,89
Rata-rata		52,71

Perhitungan rendemen fraksi air :

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Rendemen fraksi air 1} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{5,22 \text{ gram}}{10,00 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 52,2 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Rendemen fraksi air 2} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{5,31 \text{ gram}}{10,01 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 53,04 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Rendemen fraksi air 3} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{5,30 \text{ gram}}{10,02 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 52,89\%
 \end{aligned}$$



#### Lampiran 14. Formulasi dan pembuatan media

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

Infus dari otak sapi .....	12,5 gram
Infus dari hati sapi .....	5 gram
Protease peptone .....	10 gram
Glukosa .....	2 gram
Sodium chloride .....	5 gram
Di-sodium fosfat .....	2,5 gram
pH .....	7,4 ±0,2

Cara : Reagen tersebut diatas d timbang 37 gram dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml dipanaskan sampai larut sempurna, dituang dalam tabung reaksi steril kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

##### b. Formulasi dari pembuatan *Muller Hinton Agar* (MHA)

Meat infusioin .....	300 gram
Amilum .....	1,5 gram
Kasein hydrolysate .....	17,5 gram
Agar .....	17 gram
pH .....	7,3 ± 0,1

Cara : Reagen-reagen diatas di timbang 38 gram dan di larutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

##### c. Formulasi dari pembuatan *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA)

Peptone from gelatin .....	20 gram
Magnesium chloride.....	1,4 gram
Potassium sulfat .....	10 gram
Irganan .....	25 mg
Gliserol .....	20 ml
Agar .....	13,6 gram

pH ..... 7,2

Cara : timbanglah semua bahan diatas 76 gram dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml dipanaskan sampai larut sempurna, biarkan mendidih selama 3 menit dituang dalam tabung reaksi secara aseptis tiap tabung 10 ml.

d. Formulasi dari pembuatan Sulfida Indol Motility (SIM)

Peptone from casein ..... 20 gram

Peptone from meat ..... 6,6 gram

Ammonium iron (II) citrate ..... 0,2 gram

Sodium thiosulfate ..... 0,2 gram

Agar-agar ..... 3,2 gram

pH .....  $7,3 \pm 0,2$

Cara : Reagen tersebut diatas timbang 26 gram di larutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml dipanaskan sampai larut sempurna, dituang dalam tabung reaksi steril kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

e. Formulasi dari pembuatan Klinger Iron Agar (KIA)

Lab. Lemco powder ..... 3 gram

Peptone ..... 20 gram

Yeast extract ..... 3 gram

Sodium chloride ..... 5 gram

Laktosa ..... 10 gram

Glukosa ..... 1 gram

Sodiumthiosulfat ..... 0,3 gram

Phenol red ..... 0,5 gram

Ferisitrat ..... 0,3 gram

pH .....  $7,4 \pm 0,2$

Cara : Reagen tersebut diatas timbang 56 gram di larutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml dipanaskan sampai larut sempurna, dituang dalam tabung

reaksi steril kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

f. Formulasi dari pembuatan Lysine Iron Agar (LIA)

Pancreatic dan digest of gelatin .....	5 gram
Yeast extract .....	3 gram
Dextrose .....	1 gram
Lysine monohydrochloride .....	10 gram
Ammonium Iron (II) citrat .....	0,5 gram
Sodium thiosulfat .....	0,04 gram
Bromo cresol Purple .....	0,02 gram
Agar-agar .....	13,5 gram
pH .....	6,7 ± 0,2

Cara : Reagen tersebut diatas di timbang 33 gram dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml dipanaskan sampai larut sempurna, dituang dalam tabung reaksi steril kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

g. Formulasi dari pembuatan citrate Agar

Ammonium hydrogen fosfat .....	1 g
Di-potassium hydrogen fosfat .....	1 g
Sodium chloride .....	5 g
Sodium citrate .....	2 g
Magnesium sulfat .....	0,2 g
Bromo thymol blue .....	0,08 g
Agar-agar .....	15 g
pH.....	6,9 ± 0,2

Cara : Reagen tersebut diatas di timbang 24 gram dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml dipanaskan sampai larut sempurna, dituang dalam tabung reaksi steril kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

### Lampiran 15. Perhitungan pengenceran DMSO 5 % (*Dimethyl Sulfoxida*)

Pembuatan DMSO konsentrasi 5%:

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

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

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

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

$$V_2 = 5 \text{ ml}$$

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

### Lampiran 16. Pembuatan konsentrasi kotrimoksazol

$$\text{Kotrimoksazol} \frac{240 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} = \frac{4800 \text{ mg}}{100} = \frac{4,8 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} = 4,8\%$$

### Lampiran 17. Pembuatan sediaan ekstrak dan fraksi untuk uji difusi

A. Ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*)

- Konsentrasi ekstrak dan fraksi 50%

$$\begin{aligned} 50\% \text{ b/v} &= 50 \text{ gram} / 100 \text{ ml} \\ &= 1 \text{ g} / 2 \text{ ml} \end{aligned}$$

Ditimbang 1 gram ekstrak atau tiap fraksi daun bugenvil kemudian dimasukkan ke dalam vial dan diencerkan dengan DMSO 5% sebanyak 2 ml.

- Konsentrasi ekstrak dan fraksi 25%

$$\begin{aligned} 25\% \text{ b/v} &= 25 \text{ gram} / 100 \text{ ml} \\ &= 0,5 \text{ g} / 2 \text{ ml} \end{aligned}$$

Ditimbang 0,5 gram ekstrak atau tiap fraksi daun bugenvil kemudian dimasukkan ke dalam vial dan diencerkan dengan DMSO 5% sebanyak 2 ml.

- Konsentrasi ekstrak dan fraksi 12,5%

$$12,5\% \text{ b/V} = \frac{12,5 \text{ gram}}{100 \text{ ml}}$$

$$= 0,25 \text{ g} / 2 \text{ ml}$$

Ditimbang 0,25 gram ekstrak atau fraksi daun bugenvil kemudian dimasukkan ke dalam vial dan diencerkan dengan DMSO 5% sebanyak 2 ml.

#### B. Perhitungan Konsentrasi Fraksi Teraktif Untuk Uji Dilusi

- Konsentrasi 50%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 50\% = 1 \text{ ml. } 25\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 25\%}{50\%}$$

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

- Konsentrasi 25%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 25\% = 1 \text{ ml. } 12,5\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 12,5\%}{50\%}$$

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

- Konsentrasi 12,5%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 12,5\% = 1 \text{ ml. } 6,25\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 6,25\%}{50\%}$$

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

- Konsentrasi 6,25%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 6,25\% = 1 \text{ ml. } 3,125\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 3,125\%}{50\%}$$

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

- Konsentrasi 3,125%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 3,125\% = 1 \text{ ml. } 1,563\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 1,563 \%}{50 \%}$$

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

- Konsentrasi 1,563%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 1,563\% = 1 \text{ ml. } 0,781\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 0,781\%}{50 \%}$$

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

- Konsentrasi 0,781%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 0,781\% = 1 \text{ ml. } 0,391\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 0,391 \%}{50 \%}$$

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

- Konsentrasi 0,391%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 0,391\% = 1 \text{ ml. } 0,196\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 0,196 \%}{50 \%}$$

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

- Konsentrasi 0,196%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 0,196\% = 1 \text{ ml. } 0,098\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 0,098 \%}{50 \%}$$

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

- Konsentrasi 0,098%

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1 \cdot 0,098\% = 1 \text{ ml} \cdot 0,049\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 0,049\%}{50\%}$$

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

kontrol negatif (-) berisi 1 ml ekstrak/fraksi

kontrol positif (+) berisi 1 ml suspensi bakteri

## Lampiran 18. Analisis data

### NPar Tests

#### Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan kotrimoksasol	39	7.00	3.791	1	13
Diameter	39	12.74	3.633	6	20

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan kotrimoksasol	Diameter
N		39	39
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	7.00	13.00
	Std. Deviation	3.791	3.685
Most Extreme Differences	Absolute	.093	.074
	Positive	.093	.074
	Negative	-.093	-.074
Kolmogorov-Smirnov Z		.583	.464
Asymp. Sig. (2-tailed)		.886	.983

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### Oneway

#### ANOVA

Diameter

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	502.667	12	41.889	81.683	.000
Within Groups	13.333	26	.513		
Total	516.000	38			



## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Diameter  
Tukey HSD

(I) Ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan kotrimoksasol	(J) Ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan kotrimoksasol	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Ekstrak etanol 50%	Fraksi n-heksan 50%	-1.333	.585	.548	-3.46	.79
	Fraksi etil asetat 50%	-4.333	.585	.000	-6.46	-2.21
	Fraksi air 50%	4.000	.585	.000	1.88	6.12
	ekstrak etanol 25%	.667	.585	.993	-1.46	2.79
	fraksi n-heksan 25%	.333	.585	1.000	-1.79	2.46
	fraksi etil asetat 25%	-2.667	.585	.006	-4.79	-.54
	fraksi air 25%	4.667	.585	.000	2.54	6.79
	ekstrak etanol 12,5%	3.000	.585	.001	.88	5.12
	fraksi n-heksan 12,5%	2.000	.585	.079	-.12	4.12
	fraksi etil asetat 12,5%	-2.333	.585	.022	-4.46	-.21
	fraksi air 12,5%	6.667	.585	.000	4.54	8.79
	kotrimoksasol	-6.333	.585	.000	-8.46	-4.21
Fraksi n-heksan 50%	Ekstrak etanol 50%	1.333	.585	.548	-.79	3.46
	Fraksi etil asetat 50%	-3.000	.585	.001	-5.12	-.88
	Fraksi air 50%	5.333	.585	.000	3.21	7.46
	ekstrak etanol 25%	2.000	.585	.079	-.12	4.12
	fraksi n-heksan 25%	1.667	.585	.239	-.46	3.79
	fraksi etil asetat 25%	-1.333	.585	.548	-3.46	.79
	fraksi air 25%	6.000	.585	.000	3.88	8.12
	ekstrak etanol 12,5%	4.333	.585	.000	2.21	6.46
	fraksi n-heksan 12,5%	3.333	.585	.000	1.21	5.46
	fraksi etil asetat 12,5%	-1.000	.585	.873	-3.12	1.12
	fraksi air 12,5%	8.000	.585	.000	5.88	10.12
	kotrimoksasol	-5.000	.585	.000	-7.12	-2.88
Fraksi etil asetat 50%	Ekstrak etanol 50%	4.333	.585	.000	2.21	6.46
	Fraksi n-heksan 50%	3.000	.585	.001	.88	5.12
	Fraksi air 50%	8.333	.585	.000	6.21	10.46
	ekstrak etanol 25%	5.000	.585	.000	2.88	7.12
	fraksi n-heksan 25%	4.667	.585	.000	2.54	6.79
	fraksi etil asetat 25%	1.667	.585	.239	-.46	3.79
	fraksi air 25%	9.000	.585	.000	6.88	11.12
	ekstrak etanol 12,5%	7.333	.585	.000	5.21	9.46
	fraksi n-heksan 12,5%	6.333	.585	.000	4.21	8.46
	fraksi etil asetat 12,5%	2.000	.585	.079	-.12	4.12
	fraksi air 12,5%	11.000	.585	.000	8.88	13.12

	kotrimoksasol	-2.000	.585	.079	-4.12	.12
Fraksi air 50%	Ekstrak etanol 50%	-4.000	.585	.000	-6.12	-1.88
	Fraksi n-heksan 50%	-5.333	.585	.000	-7.46	-3.21
	Fraksi etil asetat 50%	-8.333	.585	.000	-10.46	-6.21
	ekstrak etanol 25%	-3.333	.585	.000	-5.46	-1.21
	fraksi n-heksan 25%	-3.667	.585	.000	-5.79	-1.54
	fraksi etil asetat 25%	-6.667	.585	.000	-8.79	-4.54
	fraksi air 25%	.667	.585	.993	-1.46	2.79
	ekstrak etanol 12,5%	-1.000	.585	.873	-3.12	1.12
	fraksi n-heksan 12,5%	-2.000	.585	.079	-4.12	.12
	fraksi etil asetat 12,5%	-6.333	.585	.000	-8.46	-4.21
	fraksi air 12,5%	2.667	.585	.006	.54	4.79
		kotrimoksasol	-10.333	.585	.000	-12.46
ekstrak etanol 25%	Ekstrak etanol 50%	-.667	.585	.993	-2.79	1.46
	Fraksi n-heksan 50%	-2.000	.585	.079	-4.12	.12
	Fraksi etil asetat 50%	-5.000	.585	.000	-7.12	-2.88
	Fraksi air 50%	3.333	.585	.000	1.21	5.46
	fraksi n-heksan 25%	-.333	.585	1.000	-2.46	1.79
	fraksi etil asetat 25%	-3.333	.585	.000	-5.46	-1.21
	fraksi air 25%	4.000	.585	.000	1.88	6.12
	ekstrak etanol 12,5%	2.333	.585	.022	.21	4.46
	fraksi n-heksan 12,5%	1.333	.585	.548	-.79	3.46
	fraksi etil asetat 12,5%	-3.000	.585	.001	-5.12	-.88
	fraksi air 12,5%	6.000	.585	.000	3.88	8.12
		kotrimoksasol	-7.000	.585	.000	-9.12
fraksi n-heksan 25%	Ekstrak etanol 50%	-.333	.585	1.000	-2.46	1.79
	Fraksi n-heksan 50%	-1.667	.585	.239	-3.79	.46
	Fraksi etil asetat 50%	-4.667	.585	.000	-6.79	-2.54
	Fraksi air 50%	3.667	.585	.000	1.54	5.79
	ekstrak etanol 25%	.333	.585	1.000	-1.79	2.46
	fraksi etil asetat 25%	-3.000	.585	.001	-5.12	-.88
	fraksi air 25%	4.333	.585	.000	2.21	6.46
	ekstrak etanol 12,5%	2.667	.585	.006	.54	4.79
	fraksi n-heksan 12,5%	1.667	.585	.239	-.46	3.79
	fraksi etil asetat 12,5%	-2.667	.585	.006	-4.79	-.54
	fraksi air 12,5%	6.333	.585	.000	4.21	8.46
		kotrimoksasol	-6.667	.585	.000	-8.79
fraksi etil asetat 25%	Ekstrak etanol 50%	2.667	.585	.006	.54	4.79
	Fraksi n-heksan 50%	1.333	.585	.548	-.79	3.46
	Fraksi etil asetat 50%	-1.667	.585	.239	-3.79	.46
	Fraksi air 50%	6.667	.585	.000	4.54	8.79
	ekstrak etanol 25%	3.333	.585	.000	1.21	5.46
	fraksi n-heksan 25%	3.000	.585	.001	.88	5.12
	fraksi air 25%	7.333	.585	.000	5.21	9.46

	ekstrak etanol 12,5%	5.667	.585	.000	3.54	7.79
	fraksi n-heksan 12,5%	4.667	.585	.000	2.54	6.79
	fraksi etil asetat 12,5%	.333	.585	1.000	-1.79	2.46
	fraksi air 12,5%	9.333	.585	.000	7.21	11.46
	kotrimoksasol	-3.667	.585	.000	-5.79	-1.54
fraksi air 25%	Ekstrak etanol 50%	-4.667	.585	.000	-6.79	-2.54
	Fraksi n-heksan 50%	-6.000	.585	.000	-8.12	-3.88
	Fraksi etil asetat 50%	-9.000	.585	.000	-11.12	-6.88
	Fraksi air 50%	-.667	.585	.993	-2.79	1.46
	ekstrak etanol 25%	-4.000	.585	.000	-6.12	-1.88
	fraksi n-heksan 25%	-4.333	.585	.000	-6.46	-2.21
	fraksi etil asetat 25%	-7.333	.585	.000	-9.46	-5.21
	ekstrak etanol 12,5%	-1.667	.585	.239	-3.79	.46
	fraksi n-heksan 12,5%	-2.667	.585	.006	-4.79	-.54
	fraksi etil asetat 12,5%	-7.000	.585	.000	-9.12	-4.88
	fraksi air 12,5%	2.000	.585	.079	-.12	4.12
	kotrimoksasol	-11.000	.585	.000	-13.12	-8.88
ekstrak etanol 12,5%	Ekstrak etanol 50%	-3.000	.585	.001	-5.12	-.88
	Fraksi n-heksan 50%	-4.333	.585	.000	-6.46	-2.21
	Fraksi etil asetat 50%	-7.333	.585	.000	-9.46	-5.21
	Fraksi air 50%	1.000	.585	.873	-1.12	3.12
	ekstrak etanol 25%	-2.333	.585	.022	-4.46	-.21
	fraksi n-heksan 25%	-2.667	.585	.006	-4.79	-.54
	fraksi etil asetat 25%	-5.667	.585	.000	-7.79	-3.54
	fraksi air 25%	1.667	.585	.239	-.46	3.79
	fraksi n-heksan 12,5%	-1.000	.585	.873	-3.12	1.12
	fraksi etil asetat 12,5%	-5.333	.585	.000	-7.46	-3.21
	fraksi air 12,5%	3.667	.585	.000	1.54	5.79
	kotrimoksasol	-9.333	.585	.000	-11.46	-7.21
fraksi n-heksan 12,5%	Ekstrak etanol 50%	-2.000	.585	.079	-4.12	.12
	Fraksi n-heksan 50%	-3.333	.585	.000	-5.46	-1.21
	Fraksi etil asetat 50%	-6.333	.585	.000	-8.46	-4.21
	Fraksi air 50%	2.000	.585	.079	-.12	4.12
	ekstrak etanol 25%	-1.333	.585	.548	-3.46	.79
	fraksi n-heksan 25%	-1.667	.585	.239	-3.79	.46
	fraksi etil asetat 25%	-4.667	.585	.000	-6.79	-2.54
	fraksi air 25%	2.667	.585	.006	.54	4.79
	ekstrak etanol 12,5%	1.000	.585	.873	-1.12	3.12
	fraksi etil asetat 12,5%	-4.333	.585	.000	-6.46	-2.21
	fraksi air 12,5%	4.667	.585	.000	2.54	6.79
	kotrimoksasol	-8.333	.585	.000	-10.46	-6.21
fraksi etil asetat 12,5%	Ekstrak etanol 50%	2.333	.585	.022	.21	4.46
	Fraksi n-heksan 50%	1.000	.585	.873	-1.12	3.12
	Fraksi etil asetat 50%	-2.000	.585	.079	-4.12	.12

	Fraksi air 50%	6.333	.585	.000	4.21	8.46
	ekstrak etanol 25%	3.000	.585	.001	.88	5.12
	fraksi n-heksan 25%	2.667	.585	.006	.54	4.79
	fraksi etil asetat 25%	-.333	.585	1.000	-2.46	1.79
	fraksi air 25%	7.000	.585	.000	4.88	9.12
	ekstrak etanol 12,5%	5.333	.585	.000	3.21	7.46
	fraksi n-heksan 12,5%	4.333	.585	.000	2.21	6.46
	fraksi air 12,5%	9.000	.585	.000	6.88	11.12
	kotrimoksasol	-4.000	.585	.000	-6.12	-1.88
fraksi air 12,5%	Ekstrak etanol 50%	-6.667	.585	.000	-8.79	-4.54
	Fraksi n-heksan 50%	-8.000	.585	.000	-10.12	-5.88
	Fraksi etil asetat 50%	-11.000	.585	.000	-13.12	-8.88
	Fraksi air 50%	-2.667	.585	.006	-4.79	-.54
	ekstrak etanol 25%	-6.000	.585	.000	-8.12	-3.88
	fraksi n-heksan 25%	-6.333	.585	.000	-8.46	-4.21
	fraksi etil asetat 25%	-9.333	.585	.000	-11.46	-7.21
	fraksi air 25%	-2.000	.585	.079	-4.12	.12
	ekstrak etanol 12,5%	-3.667	.585	.000	-5.79	-1.54
	fraksi n-heksan 12,5%	-4.667	.585	.000	-6.79	-2.54
	fraksi etil asetat 12,5%	-9.000	.585	.000	-11.12	-6.88
	kotrimoksasol	-13.000	.585	.000	-15.12	-10.88
kotrimoksasol	Ekstrak etanol 50%	6.333	.585	.000	4.21	8.46
	Fraksi n-heksan 50%	5.000	.585	.000	2.88	7.12
	Fraksi etil asetat 50%	2.000	.585	.079	-.12	4.12
	Fraksi air 50%	10.333	.585	.000	8.21	12.46
	ekstrak etanol 25%	7.000	.585	.000	4.88	9.12
	fraksi n-heksan 25%	6.667	.585	.000	4.54	8.79
	fraksi etil asetat 25%	3.667	.585	.000	1.54	5.79
	fraksi air 25%	11.000	.585	.000	8.88	13.12
	ekstrak etanol 12,5%	9.333	.585	.000	7.21	11.46
	fraksi n-heksan 12,5%	8.333	.585	.000	6.21	10.46
	fraksi etil asetat 12,5%	4.000	.585	.000	1.88	6.12
	fraksi air 12,5%	13.000	.585	.000	10.88	15.12

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

## Homogeneous Subsets

Diameter

Tukey HSD<sup>a</sup>

Ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan kotrimoksasol	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
fraksi air 12,5%	3	6.67							
fraksi air 25%	3	8.67	8.67						
Fraksi air 50%	3		9.33	9.33					
ekstrak etanol 12,5%	3		10.33	10.33					
fraksi n-heksan 12,5%	3			11.33	11.33				
ekstrak etanol 25%	3				12.67	12.67			
fraksi n-heksan 25%	3				13.00	13.00			
Ekstrak etanol 50%	3				13.33	13.33			
Fraksi n-heksan 50%	3					14.67	14.67		
fraksi etil asetat 12,5%	3						15.67	15.67	
fraksi etil asetat 25%	3						16.00	16.00	
Fraksi etil asetat 50%	3							17.67	17.67
kotrimoksasol	3								19.67
Sig.		.079	.239	.079	.079	.079	.548	.079	.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.