

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT,
DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL BIJI PINANG
(*Areca catechu L.*) TERHADAP BAKTERI
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**



Oleh :

**Elizabeth Dian Kurnisanti
20144136A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI
berjudul

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT,
DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL BIJI PINANG
(*Areca catechu L.*) TERHADAP BAKTERI
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Oleh :

Elizabeth Dian Kurniasanti
20144136A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 22 Mei 2018

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Dekan,



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

Pembimbing,

Endang Sri Rejeki, M.Si., Apt.

Pembimbing Pendamping,

Dra. Nony Puspawati, M.Si

Penguji:

1. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt
2. Dwi Ningsih, S.Si., M.Farm., Apt
3. Desi Purwaningsih, S.Pd., M.Si
4. Endang Sri Rejeki, M.Si., Apt.

1.

2.
3.

4.

PERNYATAAN

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

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

Surakarta, 22 Mei 2018



Elizabeth Dian Kurniasanti

HALAMAN PERSEMBAHAN

"Takut akan TUHAN adalah permulaan pengetahuan, tetapi orang bodoh menghina hikmat dan didikan"

Amsal 23:18

"Kiranya Engkau memberkati aku berlimpah-limpah dan memperluas daerahku, dan kiranya tanganMu menyertai aku, dan melindungi aku daripada malapetaka, sehingga kesakitan tidak menimpa aku!"

1 Tawarikh 4:10

"Sebab Aku ini mengetahui rancangan-rancangan apa yang ada pada-Ku mengenai kamu, demikianlah firman TUHAN, yaitu rancangan damai sejahtera dan bukan rancangan kecelakaan, untuk memberikan kepadamu hari depan yang penuh harapan"

Yeremia 29:11

Skripsi ini kupersembahkan kepada:

Tuhan Yesus Kristus

Bapa, Mama, adik tercinta yang telah mendukung dan mendoakanku.

Mas damas partner skripsi dan Sahabat-sahabatku tercinta

Teman - teman seperjuangan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Almamater, Bangsa dan Negara

KATA PENGANTAR

Puji Tuhan, segala puji dan syukur kepada Tuhan yang telah memberi berkat dan hikmat, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI BIJI PINANG (*Areca catechu* L.) TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853”**. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

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

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Endang Sri Rejeki, M.Si., Apt. selaku Pembimbing Utama dan Dra. Nony Puspawati, M.Si selaku Pembimbing Pendamping yang telah berkenan mengorbankan waktunya guna membimbing, memberi nasehat, dan mengarahkan penulis pada saat penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Dosen penguji yang telah memberikan masukan demi kesempurnaan dalam skripsi ini.
5. Seluruh Dosen, Asisten Dosen, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi.
6. Tuhan Yesus Kristus yang telah memberi cinta, kasih sayang, kekuatan, hikmat serta kemampuan dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Bapak, Mama, Rachel dan Gama serta seluruh keluarga besar Soewarno Adi yang telah memberikan cinta, kasih sayang, doa, dukungan dan pengorbanan, serta semangat untuk segera menyelesaikan skripsi ini.
8. Patner skripsi (Mas Damas) atas bantuan dan kerjasamanya serta semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.

9. Sahabat dan teman-teman seperjuangan skripsi (Mbak Lik dan Desi) atas bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan penelitian skripsi ini.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

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

Surakarta, 22 Mei 2018

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|----------------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| PENGESAHAN SKRIPSI | ii |
| PERNYATAAN..... | iii |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | vi |
| KATA PENGANTAR | v |
| DAFTAR ISI..... | vii |
| DAFTAR GAMBAR | xi |
| DAFTAR TABEL..... | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xiii |
| INTISARI..... | xv |
| ABSTRACT..... | xvi |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| A. Latar Belakang..... | 1 |
| B. Perumusan Masalah..... | 2 |
| C. Tujuan Penelitian..... | 3 |
| D. Manfaat Penelitian..... | 3 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 4 |
| A. Tanaman Biji Pinang | 4 |
| 1. Klarifikasi tanaman | 4 |
| 2. Morfologi tanaman | 4 |
| 3. Kandungan zat aktif biji pinang | 4 |
| 3.1. Alkaloid..... | 4 |
| 3.2. Flavonoid | 5 |
| 3.3. Saponin | 5 |
| 3.4. Tanin | 5 |
| B. Simplisia | 6 |
| 1. Pengertian simplisia | 6 |
| 2. Pengeringan simplisia..... | 6 |
| C. Penyarian | 6 |
| 1. Pengertian ekstraksi..... | 6 |
| 2. Metode ekstraksi..... | 7 |
| 2.1. Maserasi | 7 |
| 2.2. Remaserasi | 7 |
| 2.3. Perkolasi | 7 |
| 2.4. Soxhletasi | 7 |
| 2.5. Destilasi | 7 |

| | |
|---|----|
| 2.6. Refluks | 7 |
| 3. Pelarut untuk ekstraksi | 8 |
| 3.1. Etanol | 8 |
| 3.2. <i>n</i> -heksana | 8 |
| 3.3. Etil asetat..... | 8 |
| 3.4. Air | 9 |
| 4. Fraksinasi..... | 9 |
| D. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 9 |
| 1. Morfologi..... | 9 |
| 2. Klasifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 9 |
| 3. Identifikasi bakteri..... | 10 |
| 4. Toksin | 10 |
| 5. Pengobatan | 11 |
| E. Antibakteri..... | 11 |
| 1. Definisi antibakteri | 11 |
| 2. Mekanisme kerja antibakteri | 12 |
| 2.1.Penghambatan metabolisme sel bakteri | 12 |
| 2.2.Penghambatan sintesis dinding sel | 12 |
| 2.3.Penghambatan permeabilitas sel bakteri | 12 |
| 2.4.Penghambatan sintesis protein sel bakteri | 12 |
| 2.5.Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri..... | 13 |
| 3. Uji aktivitas sel bakteri..... | 13 |
| 3.1.Metode difusi | 13 |
| 3.2.Metode dilusi..... | 13 |
| F. Ciprofloksazin | 14 |
| 1. Mekanisme kerja ciprofloksasin | 14 |
| 2. Efek samping ciprofloksasin | 14 |
| 3. Resistensi ciprofloksasin | 14 |
| G. Media..... | 15 |
| 1. Media cair | 15 |
| 2. Media setengah padat | 15 |
| 3. Media padat | 15 |
| H. Sterilisasi | 15 |
| 1. Cara sterilisasi | 16 |
| 1.1.Sterilisasi uap | 16 |
| 1.2.Sterilisasi panas kering | 16 |
| 1.3.Sterilisasi gas | 16 |
| 1.4.Sterilisasi dengan radiasi ion | 16 |
| 1.5.Sterilisasi dengan penyaringan | 17 |
| I. Kromatografi Lapis Tipis | 17 |
| J. Landasan Teori | 17 |
| K. Hipotesis | 19 |
| BAB III METODE PENELITIAN | 20 |
| A. Populasi dan Sampel..... | 20 |
| 1. Populasi | 20 |

| | |
|--|----|
| 2. Sampel | 20 |
| B. Variabel Penelitian | 20 |
| 1. Identifikasi variabel utama | 20 |
| 2. Klasifikasi variabel utama | 20 |
| 3. Definisi operasional variabel utama | 21 |
| C. Bahan dan Alat | 22 |
| 1. Bahan | 22 |
| 2. Alat | 22 |
| D. Jalannya Penelitian | 23 |
| 1. Identifikasi tanaman | 23 |
| 2. Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk biji pinang | 23 |
| 3. Penetapan kadar kelembaban biji pinang | 23 |
| 4. Pembuatan ekstrak biji pinang secara maserasi | 23 |
| 5. Penetapan % rendemen | 23 |
| 6. Uji bebas etanol | 24 |
| 7. Pengujian kandungan kimia ekstrak biji pinang..... | 24 |
| 7.1. Identifikasi alkaloid | 24 |
| 7.2. Identifikasi flavonoid | 24 |
| 7.3. Identifikasi saponin | 24 |
| 7.4. Identifikasi tanin | 24 |
| 8. Fraksinasi ekstrak biji pinang..... | 25 |
| 9. Sterilisasi | 25 |
| 10. Identifikasi bakteri uji | 25 |
| 10.1. Identifikasi berdasarkan koloni..... | 25 |
| 10.2. Identifikasi dengan pewarnaan Gram | 25 |
| 10.3. Identifikasi bakteri uji secara biokimia..... | 26 |
| 10.3.1. Media SIM (<i>Sufida Indol Motility</i>) | 26 |
| 10.3.2. Media KIA (<i>Kliger Iron Agar</i>) | 26 |
| 10.3.3. Media LIA (<i>Lysine Iron Agar</i>)..... | 26 |
| 10.3.4. Media Citrat | 27 |
| 11. Pembuatan suspensi bakteri uji | 27 |
| 12. Pengujian aktivitas antibakteri. | 27 |
| 12.1. Metode difusi | 27 |
| 12.2. Metode dilusi..... | 28 |
| 13. Kromatografi lapis tipis | 28 |
| 13.2. Identifikasi alkaloid | 28 |
| 13.2. Identifikasi flavonoid | 29 |
| 13.3. Identifikasi saponin | 29 |
| 13.4. Identifikasi tanin..... | 29 |
| E. Analisis Hasil | 29 |
| F. Skema | 30 |
| BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN | 33 |
| A. Hasil Penelitian..... | 33 |
| 1. Hasil identifikasi tanaman (<i>Areca catechu L.</i>)..... | 33 |
| 1.1. Determinasi tanaman | 33 |

| | |
|--|----|
| 1.2. Deskripsi tanaman..... | 33 |
| 2. Hasil pengeringan bahan dan pembuatan serbuk | 33 |
| 3. Hasil penetapan kadar kelembaban serbuk | 34 |
| 4. Hasil pembuatan ekstrak biji pinang | 35 |
| 5. Hasil penetapan % rendemen | 35 |
| 6. Hasil pengujian bebas etanol ekstrak biji pinang | 35 |
| 7. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pinang | 36 |
| 8. Hasil fraksinasi ekstrak biji pinang | 36 |
| 9. Pembuatan suspensi bakteri..... | 38 |
| 10. Hasil identifikasi bakteri uji | 38 |
| 10.1. Identifikasi bakteri berdasarkan koloni..... | 38 |
| 10.2. Identifikasi bakteri pewarnaan Gram | 38 |
| 10.3. Identifikasi bakteri uji secara biokimia..... | 38 |
| 11. Hasil pengujian aktivitas antibakteri biji pinang..... | 39 |
| 11.1. Hasil pengujian antibakteri secara difusi | 39 |
| 11.2. Hasil pengujian antibakteri secara dilusi | 42 |
| 12. Hasil identifikasi fraksi paling aktif secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)..... | 43 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN | 45 |
| A. Kesimpulan..... | 45 |
| B. Saran | 45 |
| DAFTAR PUSTAKA | 46 |
| LAMPIRAN..... | 51 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|----------------|
| 1. Skema 1. Pembuatan ekstrak dan fraksi biji pinang | 31 |
| 2. Skema 2. Aktivitas antibakteri metode difusi | 32 |
| 3. Skema 3. Aktivitas antibakteri metode dilusi | 33 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|----------------|
| 1. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah biji pinang | 34 |
| 2. Hasil penetapan kadar kelembaban biji pinang | 34 |
| 3. Hasil penetapan kadar % rendemen ekstrak biji pinang | 35 |
| 4. Hasil uji bebas etanol ekstrak biji pinang | 35 |
| 5. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pinang | 36 |
| 6. Hasil fraksinasi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan air biji pinang | 38 |
| 7. Hasil identifikasi biokimia pada <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 39 |
| 8. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi biji pinang terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara difusi | 40 |
| 9. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif terhadap bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara dilusi | 42 |
| 10. Hasil uji KLT dari fraksi etil asetat biji pinang (<i>Areca catechu</i> L.) | 43 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|--|----------------|
| 1. Determinasi biji pinang | 51 |
| 2. Gambar tanaman pinang (<i>Areca catechu</i> L.) | 52 |
| 3. Gambar ekstrak dan fraksi biji pinang | 53 |
| 4. Gambar alat penelitian | 54 |
| 5. Gambar uji bebas etanol dan identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pinang | 55 |
| 6. Gambar hasil identifikasi dan suspensi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 56 |
| 7. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi biji pinang terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara difusi konsentrasi 50% | 57 |
| 8. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi biji pinang terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara difusi konsentrasi 25% | 57 |
| 9. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi biji pinang terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara difusi konsentrasi 12,5% | 58 |
| 10. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat biji pinang terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara dilusi | 59 |
| 11. Hasil uji KLT fraksi teraktif etil asetat dan perhitungan Rf..... | 61 |
| 12. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah | 63 |
| 13. Perhitungan rendemen ekstrak maserasi biji pinang (<i>Areca catechu</i> L.)..... | 64 |
| 14. Perhitungan rendemen fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air dari biji pinang (<i>Areca catechu</i> L.) | 65 |
| 15. Pembuatan larutan dengan berbagai konsentrasi untuk metode difusi | 66 |
| 16. Pembuatan larutan dengan berbagai konsentrai untuk metode dilusi | 67 |

| | |
|---|----|
| 17. Formulasi dan pembuatan media | 68 |
| 18. Pengolahan data dengan SPSS | 72 |

INTISARI

KURNIASANTI ED., 2018, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL BIJI PINANG (*Areca catechu* L.) TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Biji pinang (*Areca catechu* L.) merupakan tanaman asli Indonesia yang dimanfaatkan masyarakat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit. Kandungan kimia ekstrak biji pinang adalah alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari biji pinang (*Areca catechu* L.) sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan metode difusi dan dilusi. Konsentrasi yang digunakan untuk metode difusi adalah 50%; 25% dan 12,5%. Konsentrasi fraksi teraktif yang digunakan untuk metode dilusi adalah 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%. Fraksi paling aktif diuji kandungan kimia secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Hasil penelitian dengan metode difusi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan diameter hambat 16,6 mm pada konsentrasi 25% sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 12,5%. Hasil identifikasi KLT menunjukkan fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid dan tanin.

Kata kunci : Biji pinang, ekstraksi, fraksinasi, metode difusi, metode dilusi, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

ABSTRACT

KURNIASANTI ED., 2018, ANTIBACTERIAL ACTIVITY FRACTIONS OF *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE AND WATER FROM ETHANOLIC EXTRACT ARECA SEEDS (*Areca catechu* L.) AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Areca seeds is a native Indonesian plant that is utilized by traditional communities to treat various diseases. Compounds contained in areca seeds is flavonoids, alkaloids, saponins, and tannins. This research was conducted to determine the ethanolic extract, fraction activity *n*-hexane, ethyl acetate and water of areca seeds (*Areca catechu* L.) as antibacterial against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9361.

Antibacterial activity ethanol extract, *n*-hexane fraction, ethyl acetate fraction and water fraction on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 using diffusion and dilution method. The concentration used for the diffusion method is 50%; 25% and 12.5%. The most active fraction concentration used for the dilution method was 50%; 25%; 12.5%; 6.25%; 3.12%; 1.56%; 0.78%; 0.39%; 0.19%; 0.09%. The most active fractions were tested for chemical content by Thin Layer Chromatography (TLC).

The result of the research by diffusion method shows that ethyl acetate fraction is the most active fraction which can inhibit bacterial growth with 16.6 mm inhibition diameter at 25% concentration while Minimum Killable Concentration (KBM) of ethyl acetate fraction to *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 is 12,5%. The TLC identification results show that ethyl acetate fraction contains flavonoid and tanin compounds.

Keywords : Areca seeds, extraction, fraction, diffusion methods, dilution method, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia adalah negara yang kaya akan keanekaragaman hayati. Kekayaan alam yang merupakan pemberian Tuhan YME ini dimanfaatkan masyarakat untuk pengembangan obat tradisional dari tanaman yang memiliki khasiat dalam penyembuhan penyakit. Sampai sekarang obat tradisional masih banyak digunakan oleh masyarakat Indonesia karena harganya yang masih ekonomis dibandingkan dengan obat sintetis yang harganya lebih mahal karena bahan baku obat-obatan yang digunakan oleh pabrik, harganya sangat bergantung pada banyak komponen. Tanaman asli Indonesia yang tersebar luas pada beberapa daerah di Indonesia yaitu tanaman pinang atau *Areca catechu* L. Masyarakat biasanya memanfaatkan biji pinang untuk mengobati penyakit cacingan, terutama untuk mengobati cacing pita.

Infeksi merupakan penyebab utama penyakit didunia terutama didaerah tropis seperti Indonesia karena temperatur yang tropis serta kelembaban tinggi sehingga mikroba dapat tumbuh subur. Infeksi dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti virus, bakteri, jamur, riketsia, protozoa. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan penyakit infeksi pada hewan maupun manusia adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri ini merupakan penyebab utama infeksi pneumonia nosokomial, luka nanah menimbulkan pus hijau kebiruan dan meningitis bila masuk bersama pungsi lumbal (Jawetz dkk, 2012). *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif, yang berbentuk batang, motil dan bersifat aerob (Jawetz dkk, 2007).

Menurut Fitri H 2016, biji pinang (*Areca catechu* L.) mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Alkaloid mempunyai kemampuan untuk mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel. Flavonoid mempunyai kemampuan untuk membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri. Saponin mempunyai kemampuan untuk mengganggu permeabilitas membran sel bakteri. Tanin mempunyai

kemampuan untuk mempresipitasi protein, inaktivasi enzim dan inaktivasi fungsi materi genetik.

Peneliti sebelumnya telah menggunakan ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) dan terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan nilai KBM 1,57% dan untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan nilai KBM 25% (Nony 2013). Peneliti berkeinginan meneruskan penelitian terhadap biji pinang tersebut dengan fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstraksi etanol biji pinang terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Tujuan peneliti dalam melanjutkan penelitian ini yaitu untuk membandingkan antara ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air mana yang lebih efektif sebagai antibakteri.

Berdasar pada uraian tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan pada biji pinang untuk mengobati infeksi pada luka dan luka bakar khususnya pada fraksi dari ekstrak etanol biji pinang. Pengukuran aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dan dilusi terhadap fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstraksi etanol biji pinang (*Areca catechu* L.). Metode difusi digunakan untuk mengetahui diameter hambat pertumbuhan bakteri dari ekstrak dan fraksi yang kemudian didapat fraksi teraktif dilanjutkan dengan metode dilusi. Metode dilusi digunakan untuk mengetahui KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dari fraksi teraktif.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, perumusan masalah yang dihadapi yaitu:

Pertama, apakah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari biji pinang (*Areca catechu* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853?

Kedua, manakah dari ekstrak etanol dan ketiga fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan, air) yang mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853?

Ketiga, berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilihat dari fraksi teraktif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

Pertama, untuk mengetahui dan membuktikan aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan fraksi air dari biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, untuk mengetahui manakah dari ekstrak etanol dan ketiga fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) yang mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ketiga, untuk mengetahui KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dilihat dari fraksi teraktif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

D. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian yang dilakukan ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada industri farmasi, ilmu pengetahuan serta masyarakat tentang manfaat biji pinang (*Areca catechu* L.) sebagai antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sehingga dapat digunakan sebagai pengobatan infeksi bakteri selain antibiotik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Pinang

1. Klasifikasi tanaman

Menurut Syamsuhidayat and Hutapea (1991) klasifikasi sebagai berikut :

| | |
|------------|---------------------------|
| Kingdom | : Plantae |
| Divisi | : Spermatophta |
| Sub divisi | : Angiospermae |
| Kelas | : Monocotyledonae |
| Bangsa | : Arecales |
| Suku | : Arecaceae / palmae |
| Marga | : Areca |
| Spesies | : <i>Areca catechu</i> L. |

2. Morfologi tanaman

Areca catechu L. merupakan tanaman famili Arecaceae yang dapat mencapai tinggi 15-20 m dengan batang tegak lurus bergaris tengah 15 cm. Buahnya berkecambah setelah 1,5 bulan dan 4 bulan kemudian mempunyai jambul daun-daun kecil yang belum terbuka. Pembentukan batang baru terjadi setelah 2 tahun dan berbuah pada umur 5-8 tahun tergantung keadaan tanah. Tanaman ini berbunga pada awal dan akhir musim hujan dan memiliki masa hidup 25-30 tahun. Biji buah berwarna kecoklatan sampai coklat kemerahan, agak berlekuk-lekuk dengan warna yang lebih muda. Pada bidang irisan biji tampak perisperm berwarna coklat tua dengan lipatan tidak beraturan menembus endosperm yang berwarna agak keputihan (Depkes RI 1989).

3. Kandungan zat aktif pada biji pinang

Kandungan zat aktif yang terdapat dalam biji pinang sebagai berikut :

3.1 Alkaloid. Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder mengandung unsur nitrogen (N) biasanya pada cincin heterosiklik dan bersifat basa. Senyawa alkaloid kebanyakan berbentuk padatan dan berwarna putih, tetapi ada yang berupa cairan yaitu nikotin ada juga yang berwarna kuning, seperti berberin,

dan serpetin, sedangkan kolkosin dan risinin merupakan alkaloid yang bersifat tidak basa. Senyawa efredin dan meskalin merupakan contoh alkaloid dengan unsur N pada rantai alifatik yang sering disebut dengan istilah amin alkaloid atau proto alkaloid. Senyawa yang memiliki atom N, tetapi tidak termasuk dalam golongan alkaloid antara lain asam amino, amina, asam nukleat, nukleotida, porfirin, senyawa nitro, dan nitroso (Hanani 2014). Alkaloid dapat menghambat esterase, DNA dan RNA polimerase serta menghambat respirasi sel dan berperan dalam interkalasi DNA (Ajizah 2004).

3.2 Flavonoid. Flavonoid adalah golongan polifenol sehingga memiliki sifat kimia senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Flavonoid juga memiliki sejumlah gugus hidroksil sehingga pada umumnya larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, air, dan sebagainya. Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Dewanti & Wahyudi 2011).

3.3 Saponin. Saponin berasal dari bahasa latin *Saponin* yang berarti sabun karena sifatnya menyerupai sabun. Saponin merupakan senyawa aktif yang permukaannya kuat yang menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah menyebabkan hemolisis sel darah merah. Sifat-sifat saponin adalah mempunyai rasa pahit, dalam larutan air membentuk busa yang stabil, menghemolisa eritrosit, membentuk persenyawaan dengan kolesterol dan hidroksi steroid lainnya, sulit untuk dimurnikan dan diidentifikasi, berat molekul relatif tinggi (Lenny 2006). Saponin merupakan senyawa yang diduga sebagai senyawa antibakteri karena memiliki kemampuan dalam menghambat fungsi membran sel sehingga merusak permeabilitas membran yang mengakibatkan dinding sel rusak atau hancur (Ayuningtyas 2008).

3.4 Tanin. Tanin adalah senyawa polifenol yang dapat larut dalam air, gliserol, metanol, hidroalkoholik, dan propilena glikol, tetapi tidak larut dalam benzena, kloroform, eter, petroleum eter dan karbon disulfida. Tanin terdapat luas dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Tanin mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasi

protein. Efek antibakteri tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Dewanti & Wahyudi 2011).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia merupakan bahan yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun atau telah diolah secara sederhana. Simplisia dapat berupa simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang berasal dari tanaman utuh baik berupa tanaman utuh, bagaimana tanaman atau eksudat tanaman. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral yang belum atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Dalimartha 2008).

2. Pengeringan simplisia

Pengeringan simplisia bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam waktu yang lama. Pengeringan simplisia digunakan untuk mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik akan mencegah penurunan mutu dan kerusakan simplisia. Selama proses pengeringan hal yang perlu diperhatikan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara sewaktu proses pengeringan. Cara pengeringan simplisia dibagi menjadi 2 macam yaitu: pengeringan alamiah dengan menggunakan panas matahari langsung atau dengan diangin-anginkan tidak dengan sinar matahari langsung. Pengeringan buatan dengan oven atau mesin pengering yang sudah diatur suhu kelembaban, tekanan, dan aliran udaranya (Gunawan & Mulyani 2004).

C. Penyarian atau ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi atau penyarian yaitu suatu proses pemisahan senyawa matriks atau simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Metode ekstraksi yang

digunakan tergantung pada jenis, sifat fisik, dan sifat kimia kandungan senyawa yang akan diekstraksi. Pelarut yang digunakan tergantung pada polaritas senyawa yang akan disari, mulai yang bersifat non polar hingga polar, sering disebut sebagai ekstraksi bertingkat. Tujuan dilakukan ekstraksi adalah menarik atau memisahkan senyawa campurannya atau simplisia (Hanani 2014).

2. Metode ekstraksi

2.1 Maserasi. Metode ekstraksi simplisia dengan merendam dalam pelarut pada suhu kamar sehingga kerusakan atau degradasi metabolit dapat diminimalisasi. Pada proses maserasi, terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar dan didalam sel sehingga diperlukan penggantian pelarut secara berulang (Hanani 2014).

2.2 Remaserasi. Metode ekstraksi simplisia dengan pengulangan dan penambahan pelarut setelah dilakukan penyarian maserat pertama, dan seterusnya. Pelarut kedua ditambahkan sebanyak penambahan pelarut pertama (Depkes RI 2000).

2.3 Perkolasi. Metode ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut yang selalu baru, dengan mengalirkan pelarut melalui simplisia hingga senyawa tersari sempurna. Cara ini memerlukan waktu lebih lama dan pelarut yang lebih banyak. Meyakinkan perkolasi sudah sempurna, perkolat dapat diuji adanya metabolit dengan pereaksi yang spesifik (Hanani 2014).

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

2.5 Destilasi. Metode ekstraksi simplisia dengan cara menarik senyawa yang dapat ikut menguap bersama uap air. Pada proses pendinginan, senyawa dan uap akan terkondensi dan terpisah menjadi destilat air dan senyawa yang dektraksi (Hanani 2014).

2.6 Refluks. Metode ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut pada suhu titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang

relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Agar hasil penyarian lebih baik atau sempurna, refluks umumnya dilakukan berulang-ulang (3-6 kali) terhadap residu pertama. Cara ini memungkinkan terjadinya penguraian senyawa yang tidak tahan panas (Hanani 2014).

3. Pelarut untuk ekstraksi

Penyarian ekstrak biji pinang dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol dan difraksinasi dengan *n*-heksana, etil asetat, dan air. Penggunaan pelarut yang berbeda polaritasnya disebabkan kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam biji pinang mempunyai polaritas yang berbeda-beda sehingga dengan dilakukan fraksinasi akan diketahui fraksi yang paling efektif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

3.1 Etanol. Pelarut ideal yang sering digunakan adalah alkohol atau campurannya dengan air yang merupakan pelarut pengekstraksi yang mempunyai *extractive power* yang terbaik untuk hampir semua senyawa yang mempunyai berat molekul rendah seperti alkaloid, saponin, dan flavonoid (Arifianti *et al.* 2014). Pelarut etanol lebih mudah menembus membran sel untuk mengekstrak bahan intraseluler dari bahan tanaman. Hampir semua komponen diidentifikasi dari tanaman yang aktif terhadap mikroorganisme adalah senyawa organik aromatik atau jenuh, mereka paling sering diperoleh melalui etanol atau ekstraksi metanol. Metanol lebih polar dari pada etanol tetapi karena sifat sitotoksik, maka metanol tidak cocok untuk uji aktivitas antibakteri karena dapat menyebabkan hasil yang salah (Tiwari *et al.* 2011).

3.2 *n*-heksana. Pelarut *n*-heksana merupakan pelarut nonpolar berupa cairan yang jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar dan mempunyai bau seperti eter lemah atau bau seperti petroleum, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa nonpolar, misalnya golongan kandungan kimia minyak atsiri, lemak dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid, dan karotenoid (Tiwari *et al.* 2011).

3.3 Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut yang mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas rendah (Wardhani & Sulistyani 2012).

Etil asetat bersifat semi polar sehingga mampu menarik senyawa aglikon maupun glikon flavonoid. Etil asetat dapat digunakan sebagai pelarut karena dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan triterpenoid (Putri *et al.* 2013).

3.4 Air. Air adalah pelarut universal, digunakan untuk ekstrak tanaman dengan produk aktivitas antimikroba. Air digunakan sebagai penyari karena murah, mudah diperoleh, stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun, dan alamiah. Air melarutkan minyak menguap, glikosida, flavonoid, tanin, gula, gom, pati, protein, enzim, lilin, pektin, zat warna dan asam organik. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan karena zat ikutan tersari sehingga zat lain yang tidak diperlukan mengganggu proses penyarian (Depkes 1986; Tiwari *et al.* 2011).

4. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu golongan utama yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Pemisahan jumlah dan jenisnya menjadi fraksi yang berbeda, mula-mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari pelarut kurang polar, dan yang terakhir disari dengan pelarut polar (Harborne 1987).

D. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

1. Morfologi

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang lurus atau lengkung, berukuran sekitar $0,6 \times 2 \mu\text{m}$. Bakteri ini dapat ditemukan satu-satu maupun berpasangan kadang berbentuk rantai pendek, tidak mempunyai selubung, tidak mempunyai spora, serta mempunyai flagel monotrika (flagel tunggal pada kutub) sehingga selalu bergerak (Mayasari 2005).

2. Klasifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

Menurut Radji (2010) Sistematika bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sebagai berikut :

| | |
|-----------|---------------------------------|
| Kingdom | : Prokaryota |
| Divisi | : Protophyta |
| Subdivisi | : Schizomycetae |
| Kelas | : Schizomycetes |
| Ordo | : Pseudomonadales |
| Familia | : Pseudomonadaceae |
| Genus | : Pseudomonas |
| Spesies | : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |

3. Identifikasi bakteri

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri obligat aerob yang mudah tumbuh pada berbagai medium kultur, kadang-kadang menghasilkan aroma yang manis atau berbau seperti anggur. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni yang bundar dan licin dengan warna kehijauan yang berfluoresensi. Bakteri ini sering menghasilkan pigmen kebiruan tak berfluoresensi, *piocyanin* yang berdifusi ke dalam agar. Banyak galur *Pseudomonas aeruginosa* juga menghasilkan pigmen berfluoresensi, *pioverdin* yang memberikan warna kehijauan pada agar. Beberapa galur menghasilkan pigmen merah gelap, *piorubin*, atau pigmen hitam, *piomelanin*.

Pseudomonas aeruginosa tumbuh dengan baik pada suhu 37-40°C, bersifat oksidase-positif. *Pseudomonas aeruginosa* tidak memfermentasi karbohidrat, tetapi banyak galur yang mengoksidasi glukosa. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* biasanya didasarkan pada morfologi koloni, kepositifan oksidase, adanya pigmen khas, dan pertumbuhan pada suhu 42°C (Jawetz *et al* 2012).

4. Toksin

Pseudomonas aeruginosa hanya patogen bila masuk ke dalam daerah pertahanan normalnya tidak ada atau bila berperan dalam infeksi campuran. Kuman ini menyebabkan infeksi luka dan luka bakar membentuk nanah yang berwarna biru-hijau, meningitis, bila dimasukkan dalam punksi lumbal, dan infeksi saluran kemih, bila dimasukkan dalam kateter dan alat-alat atau dalam larutan irigasi. Terserangnya

saluran napas, khususnya dari alat respirator yang terkontaminasi mengakibatkan *Necrotizing pneumonia*. Infeksi jaringan kornea dapat menyebabkan kebutaan. Infeksi lokal kuman ini dapat menyebar melalui darah, sehingga dapat menyebabkan septisemia dan lesilokal pada jaringan lain. Pada septisemia angka kematian dapat mencapai 80% (Jawetz *et al* 2005).

Pseudomonas aeruginosa dapat mensintesis toksin enzim yang mematikan bagi manusia lipid A (endotoksin) berada didinding sel dari bakteri merupakan zat penyebab demam, vasodilatasi, inflamasi, dan gejala lain. Exotoxin A dan exoenzim S dapat menghambat sintesis protein eukariotik sel yang menyebabkan kematian sel. *Pseudomonas aeruginosa* juga memiliki enzim elastase yang dapat mempunyai efek histotoksik dan mempermudah invasi organisme ini ke dalam pembuluh darah (Bauman 2007).

5. Pengobatan

Pseudomonas aeruginosa dapat menyebabkan infeksi pneumonia, bakteremia, otitis eksterna, infeksi ocular, dan infeksi saluran kemih. Antibiotik β -laktam, kuinolon dan aminoglikosida merupakan pilihan utama bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Bamford & Gillespie 2007).

Antibiotik pilihan pertama bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah penisilin antipseudomonas dan golongan aminoglikosida seperti gentamisin, tobramysin, dan amikasin. Antibiotik alternatif untuk *Pseudomonas aeruginosa* adalah penisin dikombinasi quinolon, cefepime, ceftaxididime, imipenem, meropenem atau aztreonam dikombinasi aminoglikosida (Katzung 2007).

E. Antibakteri

1. Definisi antibakteri

Suatu senyawa yang dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan suatu mikroorganisme (Jawetz *et al* 2007). Beberapa istilah yang digunakan untuk menjelaskan proses pembasmian bakteri yaitu germasid, bakterisid, bakteristatik, antiseptik, desinfektan (Dianasari 2009).

Germasid adalah bahan yang dipakai untuk membasmi mikroorganisme dengan mematikan sel-sel vegetatif, tetapi tidak selalu mematikan bentuk-bentuk

sporanya. Bakteriasid adalah bahan yang dipakai untuk mematikan bentuk-bentuk vegetatif bakteri. Bakteristatik adalah suatu bahan yang mempunyai kemampuan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme dengan mencegah pertumbuhan bakteri tanpa mematikan. Antiseptik adalah suatu bahan yang menghambat atau membunuh mikroorganismse dengan mencegah pertumbuhan atau menghambat aktivitas metabolisme, digunakan pada jaringan hidup. Desinfektan adalah bahan yang dipakai untuk membasmi bakteri dan mikroorganisme patogen tetapi belum tentu beserta sporanya digunakan pada benda mati (Pelczer & Chan 1988).

2. Mekanisme kerja antibakteri

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

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

2.3. Perubahan permeabilitas sel bakteri. Selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut, dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Kerusakan beberapa membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain (Gunawan & Mayuni 2009).

2.4. Penghambatan sintesis protein sel bakteri. Bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA yang salah dibaca tRNA. Antibakteri bekerja dalam menyebabkan kode pada mRNA yang salah dibaca

tRNA pada sintesis protein yang abnormal dan fungsional bagi sel mikroba (Gunawan & Mayuni 2009).

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

3. Uji aktivitas sel antibakteri

3.1. Metode difusi. *Disc diffusion metode (tes Kircy & Bauer)* untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan atau cakram disk yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut (Pratiwi 2008). Metode cakram (*tes Kircy & Bauer*) menggunakan piringan atau cakram yang berisi agen antimikroba kemudian diletakkan pada media agar yang sebelumnya telah ditanami mikroorganisme sehingga agen antimikroba dapat berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Pratiwi 2008). Pengujian ini dapat dievaluasi ada tidaknya aktivitas antibakteri dengan melihat kemampuan ekstrak tersebut menghambat pertumbuhan bakteri pada media tersebut. Daerah hambatan yang terbentuk ditunjukkan dengan lingkungan bening disekitar cakram yang berisi larutan uji. Ukuran cakram disk yang digunakan 6 mm. Keuntungan dari metode difusi dibandingkan metode yang lainnya yaitu lebih ekonomis, sederhana, mudah dibuat, dan reproduisible. Prosedur yang paling sering digunakan dan dianjurkan oleh WHO (*World Health Organisation*) dan NCCLS (*Nation Comitte for linica Laboratory Standars*) adalah metode difusi cakram modifikasi *Kirby Bauer*.

3.2. Metode dilusi. Metode dilusi dilakukan dengan cara mencampurkan secara homogen suatu obat dalam media dengan jumlah yang berbeda-beda, masing-masing media ditambahkan suspensi bakteri kemudian diinkubasi dan diamati daerah media yang jernih (Bonang & Koewandoro 1982). Metode ini

menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap pada media cair maupun padat. Media diinokulasi terhadap bakteri uji, selanjutnya diinkubasi dan diamati konsentrasi antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji. Keuntungan metode ini adalah memberikan hasil kualitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al.* 1986), dan satu konsentrasi agen antimikroba yang di uji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi 2008). Kekurangan metode dilusi yaitu sampel yang digunakan harus jernih karena jika keruh akan mempersulit pengamatan (Putra 2010).

F. Ciprofloksasin

1. Mekanisme kerja ciprofloksasin

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

2. Efek samping ciprofloksasin

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

3. Resistensi ciprofloksasin

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

G. Media

Media merupakan suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat untuk menumbuhkan mikroorganisme, isolasi, memperbanyak jumlah, menguji sifat-sifat fisiologis, dan perhitungan jumlah mikroorganisme. Proses pembuatan media hasil disterilisasi dan menerapkan metode sepsis untuk menghindari kontaminasi pada media (Sumarsih 2003). Media yang digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangbiakan mikroorganisme tersebut harus sesuai susunannya dengan kebutuhan jenis-jenis mikroorganisme yang bersangkutan. Media berdasarkan bentuk terbagi menjadi tiga bagian, yaitu :

1. Media cair

Media cair juga dikenal dengan media sintetik. Media sintetik digunakan untuk mempelajari sifat faal dan genetika mikroorganisme. Media sintetik merupakan media yang mempunyai kandungan dan bahan yang telah diketahui secara terperinci. Senyawa anorganik dan senyawa organik yang ditambahkan dalam media sintetik harus murni. Contoh media sintetik : cairan Hanks, Locke, Eagle (Waluyo 2004).

2. Media setengah padat

Media ini digunakan untuk melihat gerak kuman secara mikroskopis. Media setengah padat merupakan media yang dibuat dengan bahan yang sama dengan media padat, akan tetapi yang berbeda adalah komposisi dari agar (Waluyo 2004).

3. Media padat

Media padat diperoleh dengan menambahkan agar-agar. Agar berasal dari ganggang/alga yang berfungsi sebagai bahan pematat, karena bahan ini tidak terurai oleh mikroorganisme, dan dapat membeku pada suhu 45°C (Waluyo 2004).

H. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan upaya yang dapat dilakukan untuk memusnahkan mikroorganisme. Pemanasan merupakan salah satu cara yang paling umum digunakan dalam membunuh mikroorganisme beserta sporanya. Bahan-bahan kimia tertentu juga dapat digunakan sebagai desinfektan. Beberapa faktor yang

mempengaruhi efektivitas prosedur pemusnahan mikroorganisme adalah konsentrasi senyawa antimikroba, pengaruh lingkungan atau keberadaan zat-zat organik yang dapat menghambat antimikroba kimiawi, sifat-sifat mikroba, dan daya tahan terhadap efektivitas prosedur pemusnahan (Radji 2011).

1. Cara sterilisasi

Menurut Anomim (2013) ada 5 metode sterilisasi akhir, termasuk cara pemisahan bakteri dengan cara penyaringan serta pedoman dari aseptik.

1.1 Sterilisasi uap. Sterilisasi uap adalah proses sterilisasi yang menggunakan uap jenuh yang dilakukan dalam suatu bejana yang disebut autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Prinsip dasar sterilisasi ini adalah uap dalam bejana sterilisasi digantikan dengan uap jenuh menggunakan alat pembuka dan penutup khusus. Siklus yang terjadi selama proses sterilisasi adalah evakuasi uap dan udara.

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

1.3 Sterilisasi gas. Metode sterilisasi alternatif untuk bahan-bahan yang tidak tahan panas pada sterilisasi uap dan sterilisasi uap kering. Bahan yang paling sering digunakan pada sterilisasi gas adalah etilen oksida. Kelemahan dari bahan ini adalah sifatnya yang mudah terbakar walaupun sudah dicampur dengan bahan inert yang sesuai, bersifat mutagenik, dan kemungkinan bersifat toksik terhadap bahan yang mengandung ion klorida. Pada sterilisasi ini bejana dirancang mirip dengan autoklave yang ditambah bagian khusus untuk proses penambahan gas.

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

1.5 Sterilisasi dengan penyaringan. Metode sterilisasi ini digunakan untuk cairan yang labil terhadap panas yang dilakukan menggunakan bahan yang dapat menahan mikroba sehingga mikroba dapat tertahan dan dapat disaring secara fisika. Perangkat penyaring biasanya terdiri dari matriks berpori bertutup kedap atau rangkaian wadah yang tidak permeabel. Keefektifan dari suatu media penyaring ditentukan oleh ukuran pori-pori media dan daya absorpsi mikroba terhadap zat yang terdapat dalam matriks atau tergantung juga terhadap mekanisme dari pengayakan.

I. Kromatografi Lapis Tipis

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

J. Landasan Teori

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri gram negatif, yang berbentuk batang, motil, dan bersifar aerob. Kuman ini menyebabkan infeksi luka dan luka bakar membentuk nanah yang berwarna biru-hijau, meningitis, bila dimasukkan dalam punksi lumbal, dan infeksi saluran kemih, bila dimasukkan dalam kateter dan alat-alat atau dalam larutan irigasi.

Bahan alami seperti biji pinang merupakan sumber potensial yang memiliki senyawa metabolit yang mempunyai efek antibakteri. Biji pinang (*Areca catechu L.*) mengandung beberapa senyawa metabolit diantaranya adalah alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin (Fitri H 2016).

Penelitian Caesar (2017) bahwa konsentrasi ekstrak biji pinang 30%, 60%, dan 90% merupakan konsentrasi yang efektif untuk menghambat bakteri *Escherichia coli* karena termasuk dalam kategori kuat. Konsentrasi ekstrak 60% dan 90% merupakan konsentrasi yang efektif untuk menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* karena termasuk dalam kategori sangat kuat.

Menurut penelitian dari Muhtadi (2012) bahwa fraksi etil asetat dapat menghambat bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis* dengan diameter hambat yang paling besar jika dibandingkan dengan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, dan fraksi air. Hasil KLT fraksi etil asetat biji pinang (*Areca catechu L.*) menunjukkan bahwa adanya senyawa flavonoid, saponin, dan tanin (Perdina 2014).

Etil asetat merupakan pelarut semi polar yang mudah terbakar dan menguap, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas (Depkes 1979). Etil asetat dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan triterpenoid (Putri *et al.* 2013). Air dipertimbangkan sebagai pelarut karena stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun, dan alamiah. Air disamping melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tanin dan gula, juga melarutkan pati, protein, lender, lilin, lemak, pektin, zat warna, dan asam organik (Depkes 1986).

Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol yang mempunyai sifat efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri, virus, dan jamur. Saponin merupakan glukosida yang larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter. Tanin berperan juga sebagai antibakteri dengan mengikat protein sehingga pembentukan dinding sel akan terhambat.

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan.

Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Secara teknologi maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Depkes 2000).

Metode fraksinasi adalah cara untuk metode pemisahan golongan senyawa utama, kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya senyawanya (Mukhriani 2014). Pemilihan pelarut harus mempertimbangkan beberapa faktor yaitu murah, mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, selektif yang hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat, sehingga pelarut yang digunakan adalah etanol 96%, *n*-heksana, etil asetat, dan air.

K. Hipotesis

Berdasarkan teori dan hasil penelitian terdahulu, maka dapat ditentukan hipotesis sebagai berikut :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari biji pinang (*Areca catechu* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, fraksi etil asetat merupakan fraksi paling aktif dari ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ketiga, dapat menentukan nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dilihat dari fraksi etil asetat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

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

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji pinang (*Areca catechu* L.) yang diambil pada bulan November 2017 secara random. Biji pinang yang diambil memiliki kulit buah yang berwarna hijau dan berbentuk utuh.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari biji pinang (*Areca catechu* L.).

Variabel utama kedua adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang biasa diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya, hasil yang didapatkan tidak menyebar dan dapat dilakukan peneliti lain secara tepat. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian.

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

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, kondisi laboratorium (meliputi: kondisi inkas yang digunakan dalam keadaan steril, alat, dan bahan yang digunakan harus dalam keadaan steril), media yang digunakan dalam penelitian, waktu panen, pemilihan biji, dan metode ekstraksi.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang dipengaruhi oleh ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari biji pinang (*Areca catechu* L.).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, biji pinang adalah biji dari tanaman pinang (*Areca catechu* L.) yang dipetik secara acak dengan ciri-ciri buah berwarna hijau, yang diambil di daerah Solo.

Kedua, serbuk biji pinang (*Areca catechu* L.) yaitu serbuk yang diperoleh dari biji pinang yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir dimaksudkan agar kotoran yang menempel dapat hilang, dikeringkan dengan oven suhu 50°C, selanjutnya digiling dan diayak dengan pengayak nomor 40.

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

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

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

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

Ketujuh, bakteri uji dari penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, metode difusi adalah metode untuk menentukan daya hambat dari ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, kontrol (-) DMSO 5%, dan kontrol (+) ciprofloksasin.

Kesembilan, metode dilusi adalah metode untuk menentukan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) yaitu berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,09%. Kontrol negatif berisi fraksi teraktif yang diencerkan dengan konsentrasi 50% dan kontrol positif berisi suspensi bakteri untuk membandingkan tingkat kekeruhan dari tabung lain.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan antara lain: biji pinang (*Areca catechu* L.), n-heksana, etil asetat, air, metanol, asam sulfat, asam asetat, asam klorida, serbuk Mg, *Mc Farland* 0,5, DMSO 5%, cakram disk, etanol 96%, aquadest, aquadestilata, HCl, HCl 2N, amil alkohol, FeCl₃ 1%, FeCl₃ 5%, silika gel GF₂₅₄, kloroform, LB (*Liberman Bourchat*), sitoborat, erlich A, erlich B, reagen Mayer, reagen Dragendrof, aquadest, *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Kligler Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Citrat, Pseudomonas Selektif Agar* (PSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2. Alat

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

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi tanaman

Tahapan pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah identifikasi tumbuhan biji pinang (*Areca catechu* L.) yang dilakukan di Universitas Setia Budi. Identifikasi ini bertujuan untuk mencocokkan ciri makroskopis dan mikroskopis, selain itu juga berfungsi untuk mencocokkan ciri morfologi yang ada pada biji pinang (*Areca catechu* L.).

2. Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

Biji pinang yang sudah disortasi basah, dicuci bersih dengan air mengalir, dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 2-3 hari yang bertujuan untuk mengurangi kadar air untuk mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Simplisia yang telah kering dihaluskan dengan digiling kemudian diayak dengan menggunakan ayakan no. 40.

3. Penetapan kadar kelembaban biji pinang

Penetapan kadar kelembaban serbuk biji pinang pada penelitian ini dilakukan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Penetapan kadar kelembaban serbuk biji pinang dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Serbuk ditimbang 2 gram, dimasukkan ke dalam alat *moisture balance*. Kemudian *moisture balance* ditutup dan ditunggu sampai ada bunyi pada alat sebagai tanda. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat *moisture balance* dicatat sebagai kadar kelembaban.

4. Pembuatan ekstrak etanol secara maserasi

Serbuk biji pinang (*Areca catechu* L.) sebanyak 1200 gram dimasukan ke dalam botol kaca dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 12 liter, kemudian campuran didiamkan selama 5 hari dengan sesekali digojog. Hasil kemudian disaring dan dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C.

5. Penetapan % rendemen

Penetapan % rendemen diperoleh dari hasil ekstrak pekat kemudian ekstrak pekat dibagi dengan berat serbuk biji pinang kemudian dikalikan 100%

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

6. Uji bebas etanol

Ekstrak yang telah pekat diuji sudah bebas etanol atau belum dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol jika tidak tercium bau ester yang khas dari etanol. Tujuan dilakukannya tes bebas etanol ini bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri (Kurniawati 2015).

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pinang

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

7.1 Identifikasi alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan metode Mayer dan Dragendorff, menimbang 0,5 gram ekstrak pekat biji pinang ditambahkan dengan 1 mL HCL 2M dan 9 mL aquadest dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi 2 bagian, kemudian satu bagian ditambahkan dengan pereaksi Mayer terbentuk endapan berwarna putih kekuningan dan satu bagian ditambahkan pereaksi Dragendorff terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Setyowati 2014).

7.2 Identifikasi flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak pekat biji pinang dalam metanol panas dan menambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCL pekat dan amil alkohol, dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan hingga memisah. Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Setyowati 2014).

7.3 Identifikasi saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak pekat biji pinang ditambahkan aquadestilata, kemudian dipanaskan selama 2 sampai 3 menit. Setelah dipanaskan tunggu sampai dingin lalu kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil dan setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang menandakan adanya kandungan saponin (Ramyashree *et al.* 2012).

7.4 Identifikasi tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak pekat biji pinang dalam 10 mL aquadest kemudian filtrat ditambah dengan 3 tetes FeCl₃ 1%. Hasil positif menunjukkan perubahan warna menjadi hijau kehitaman (Setyowati 2014).

8. Fraksinasi biji pinang

Pertama fraksinasi dari ekstrak etanol biji pinang dibuat dengan cara ditimbang dari ekstrak kental hasil maserasi. Ekstrak kental yang telah ditimbang dilarutkan dengan etanol dan aquadestilata, kemudian dipisahkan dalam corong pisah dengan ditambahkan *n*-heksana, dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan disebut sebagai fraksi *n*-heksana.

Kedua, residu dari fraksinasi *n*-heksana kemudian dipisahkan dalam corong pisah dengan ditambahkan etil asetat, dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Hasil fraksinasi yang didapatkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan kemudian ditimbang dan disebut sebagai fraksi etil asetat.

Ketiga, residu dari fraksi etil asetat dipekatkan dengan cara diuapkan pada suhu kamar, karena masih terdapat kandungan air yang cukup banyak maka dipekatkan kembali menggunakan waterbath suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ kemudian ditimbang dan disebut sebagai fraksi air.

9. Sterilisasi

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan oven pada suhu 170°-180°C selama 2 jam, sedangkan alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung, inkas disterilkan dengan menggunakan formalin (Suwiawiria 2005).

10. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

10.1. Identifikasi bakteri berdasarkan koloni. Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasi pada medium PSA (*Pseudomonas Selektif Agar*) dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Penampakan membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen berwarna kehijauan (Jawetz *et al* 2007).

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

10.3. Identifikasi bakteri secara biokimia. Bakteri uji *Pseudomonas aureginosa* dapat diketahui sifat fisiologinya dengan inokulasi pada media- media uji biokimia. Macam media yang digunakan inokuasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* adalah SIM (*Sulfide Indol Motilitas*), KIA (*Klinger Iron Agar*), LIA (*Lysine Iron Agar*), Citrat. Masing-masing media tersebut diinokulasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Hasilnya dapat diketahui dengan perubahan warna masing-masing media atau dengan penambahan reagen.

10.3.1. Media KIA (*Klinger Iron Motility*). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara tusukan dan goresan dengan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Hasil K/KS- untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yaitu bagian lereng berwarna merah ditulis K, bagian dasar berwarna merah ditulis K, sulfida negatif yaitu tidak terbentuk warna hitam pada media yang ditulis S-.

10.3.2. Media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfide, indol, dan motilitas bakteri. Hasil uji sulfida (-) untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, yaitu tidak terdapat warna hitam pada media, uji indol (-) yaitu

terbentuk warna merah pada bagian atasnya setelah ditambahkan dengan reagen Erlich A dan B, uji motilitas (+) yaitu pertumbuhan bakteri menyebar pada media.

10.3.3. Media LIA (*Lisin Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi dari hasil sulfida. Hasil K/KS- untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yaitu lereng berwarna ungu ditulis K, dasar berwarna ungu ditulis K, dan sulfida negatif yaitu tidak terbentuk warna hitam pada media ditulis S-.

10.3.4. Media Citrat. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara goresan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Hasil positif (+) untuk *Pseudomonas aeruginosa* yaitu media berwarna hijau berubah menjadi warna biru (Power & Mc Cuen 1988).

11. Pembuatan suspensi bakteri Uji

Biakan murni *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diambil dengan jarum ose steril. Kemudian dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril yang telah berisi media BHI (*Brain Heart Infusion*) cair, yang kemudian kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan modifikasi *Mc farland* 0,5, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam selama 37°C.

12. Pengujian aktivitas antibakteri

12.1. Metode difusi. Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji dan mengetahui fraksi teraktif yang dilihat dari daya hambat yang paling besar. Metode difusi menggunakan cawan petri steril yang telah diisi dengan media MHA sebanyak 30 ml. Bakteri diencerkan dengan mencampurkan 1 ose bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ke dalam 10 mL media BHI dengan perbandingan 1:1000, dihomogenkan dengan vortex dan kekeruhan distandarisasi dengan 0,5 *Mc farland* kemudian suspensi bakteri diinokulasikan pada cawan petri yang telah berisi MHA (*Mueller-Hinton Agar*) secara aseptis dengan usapan menggunakan kapas lidi steril. Paper disk kosong yang telah direndam 15 menit didalam masing-masing ekstrak etanol 96%

dan 3 fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) dengan seri konsentrasi 12,5%, 25%, 50% diletakkan pada permukaan agar. Kontrol positif menggunakan ciprofloksasin dan kontrol negatif menggunakan DMSO 5% kemudian diulangi sebanyak 3 kali. Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya, setelah itu diukur diameter zona hambat sekitar permukaan yang dinyatakan dalam satuan mm kemudian didapat fraksi teraktif dari diameter zona hambat yang paling besar. Daerah atau zona bening yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar permukaan cakram disk menandakan bahwa kandungan kimia biji pinang memiliki daya hambat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* (Bonang & Koeswardono 1982).

12.2. Metode dilusi. Metode dilusi digunakan untuk mengetahui KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). Metode dilusi menggunakan 12 tabung steril. Konsentrasi larutan stok yang dibuat adalah 50%, yang diencerkan dengan pelarut DMSO 5%. Secara aseptis dari larutan stok tersebut dibuat deret konsentrasi di bawahnya yaitu kontrol (-) yang berisi larutan stok; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09% dan kontrol (+) yang berisi suspensi bakteri. Media BHI dimasukkan 0,5 ml pada tiap tabung kecuali tabung kontrol (-), kontrol (+) dan tabung 1. Secara aseptis, masukkan 1 ml larutan stok yang akan diuji pada tabung kontrol (-), kemudian pada tabung 1 dan 2 dimasukkan 0,5 ml larutan stok, kemudian dari tabung 2 dipipet 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung 3 begitu seterusnya sampai tabung 10 kemudian dibuang. Ditambahkan 0,5 ml biakan bakteri dari tabung 1 sampai tabung 12. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya, kemudian didapat nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif yaitu PSA (*Pseudomonas Selektif Agar*) untuk masing-masing bakteri uji. Bakteri yang sudah digoreskan pada media PSA diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 24-48 jam. Diamati ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media selektif *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

13. Kromatografi Lapis Tipis

13.1. Identifikasi alkaloid. Untuk mengetahui adanya senyawa flavonoid maka dilakukan identifikasi dengan menggunakan KLT yaitu fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan kloroform : etanol (96:4) dengan pereaksi semprot Dragendorf. Bila dengan UV₂₅₄ nm berwarna coklat kehitaman, UV₃₆₆ nm berwarna hijau. (Budiman *et al.* 2010).

13.2. Identifikasi flavonoid. Untuk mengetahui adanya senyawa flavonoid maka dilakukan identifikasi dengan menggunakan KLT yaitu fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan kloroform : metanol (2:3) dengan pereaksi semprot sitroborat. Bila dengan UV₂₅₄ nm memberikan peredaman, UV₃₆₆ nm berfluoresensi biru, kuning, ungu gelap (Harborne 1987).

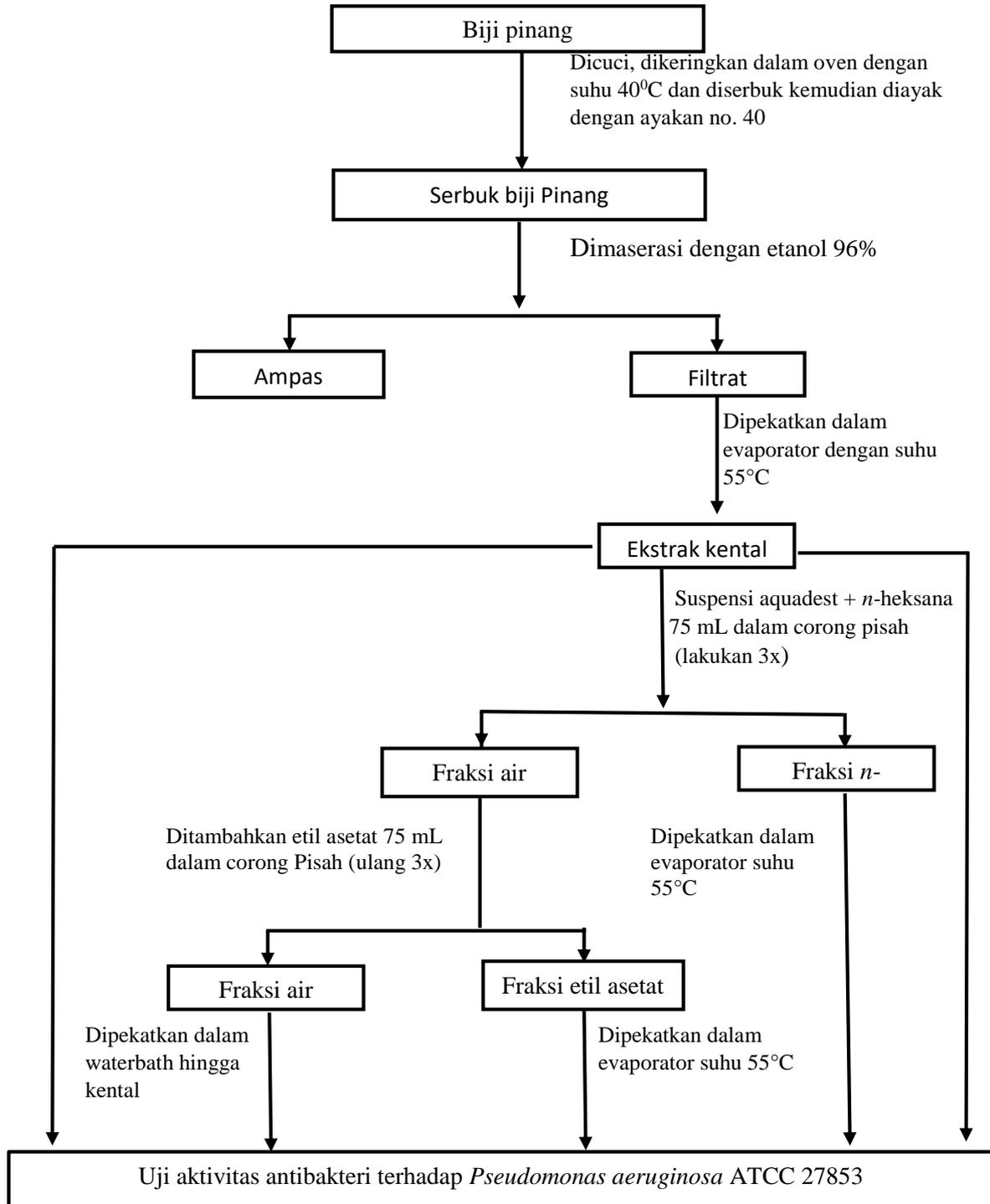
13.3. Identifikasi saponin. Identifikasi saponin menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya yaitu kloroform : metanol : aquades (13:7:2). Kemudian dideteksi di bawah sinar UV₂₅₄ sehingga akan memberikan warna gelap dan UV₃₆₆ berwarna hijau. Lempong juga disemprotkan dengan pereaksi LB (*Lieberman Bourchat*) dan dipanaskan pada suhu 110°C selama 2 menit untuk memperjelas warna noda yang terbentuk (Suharto *et al.* 2012).

13.4. Identifikasi tanin. Untuk mengidentifikasi tanin menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah metanol : aquadest (6:4). Dideteksi di bawah sinar UV₂₅₄ berwarna hijau gelap dan UV₃₆₆ biru hitam dengan pendeteksi FeCl₃ 5% (Era 2017).

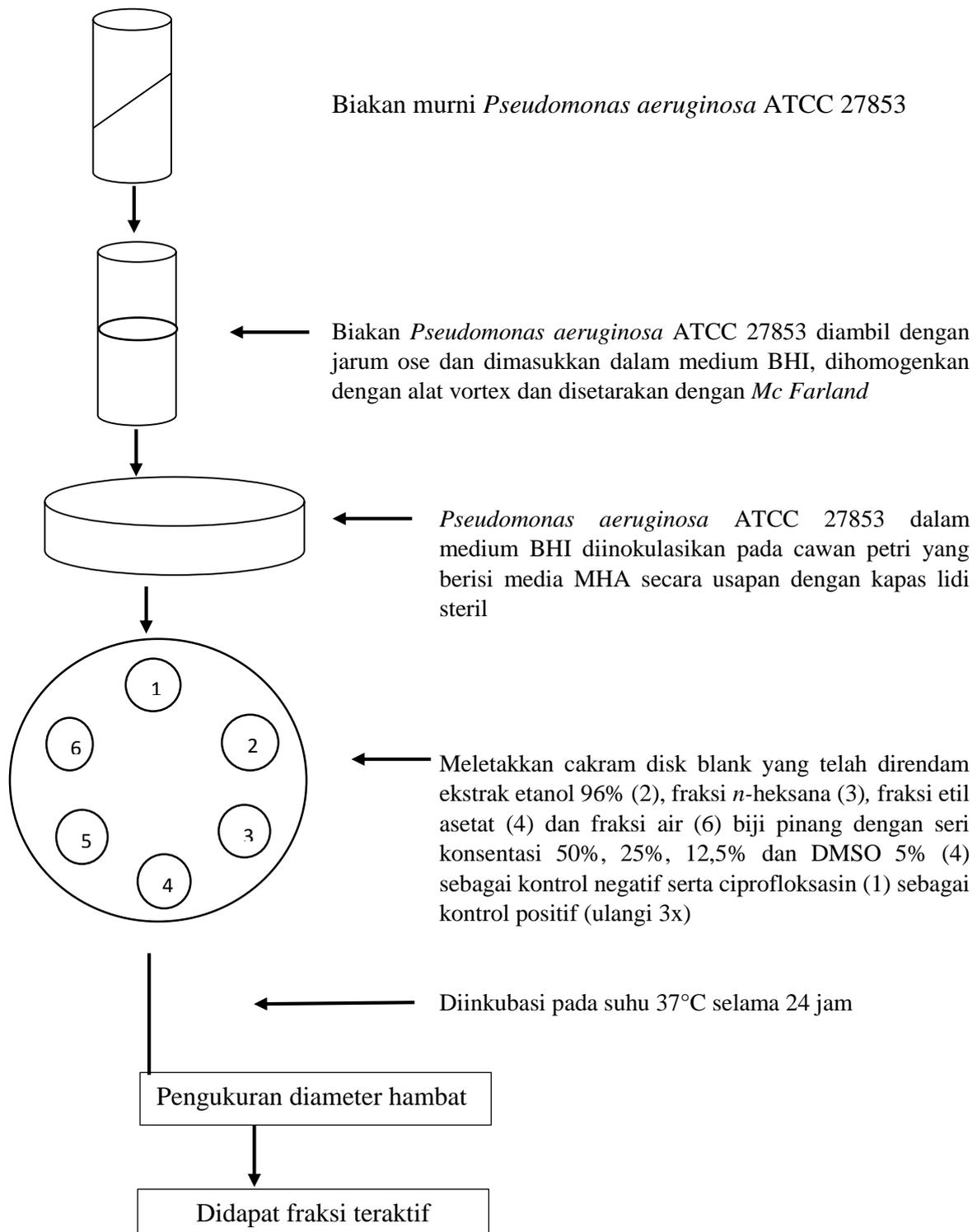
E. Analisis hasil

Hasil penelitian dianalisis berdasarkan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 di cawan petri dan dimedia selektif menggunakan metode pengujian difusi. Hasil data yang didapatkan dianalisis menggunakan statistika metode Anova Satu Jalan.

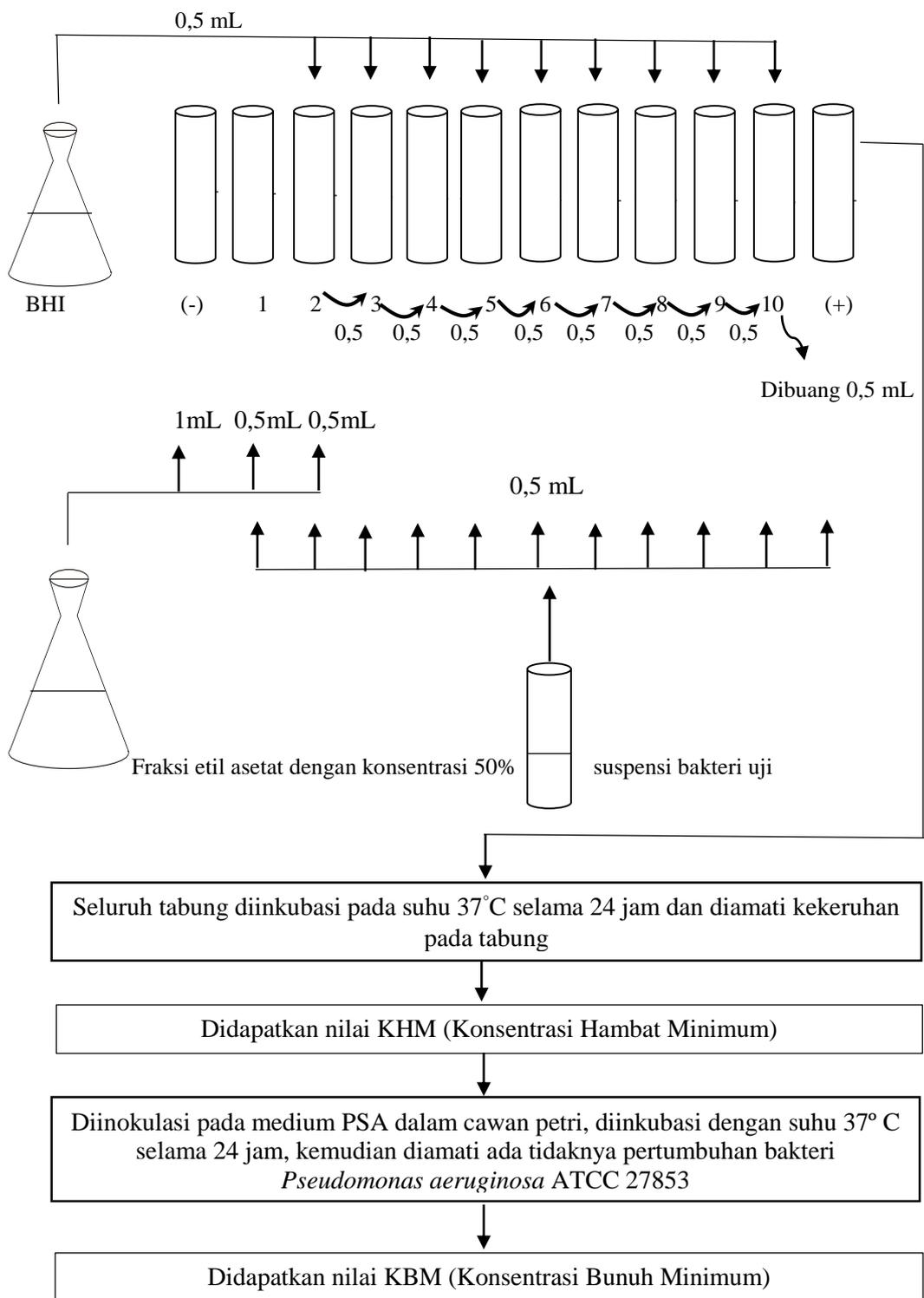
F. SKEMA



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol biji pinang dan fraksinasi biji pinang (*Areca catechu L.*)



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



Gambar 3. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan metode dilusi

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil dan pembahasan penelitian

1. Hasil identifikasi tanaman pinang (*Areca catechu* L.)

1.1 Determinasi tanaman. Tujuan dilakukan determinasi adalah untuk mencocokkan ciri makroskopis dan mikroskopis, selain itu berfungsi untuk mencocokkan ciri morfologi yang ada pada biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Hasil determinasi berdasarkan Steenis Flora 1b 2b 3b 4b 6b 7a 8b. Familia 21. Palmae. 1b 3b 4b 6b 7a 7b 9b.10. *Areca. Areca catechu* L.

1.2 Deskripsi tanaman. Deskripsi tanaman pinang sebagai berikut : pohon dengan tinggi 25 m. Batang tidak bercabang, lansing, besar lk 15 cm, tajuk tidak rimbun. Pelepah daun berbentuk tabung, panjang lk 79 cm, tangkai daun pendek, anak daun 78 cm, lebar lk 5cm, ujung sobek dan bergigi. Tongkol bunga dengan seludang (spatha) yang panjang dan mudah rontok, muncul dibawah daun, panjang lk 75 cm, dengan tangkai pendek bercabang rangkap, sumbu ujung sampai panjang 35 cm. Bunga jantan panjang 4 mm, putih kuning, benangsari 6. Bunga betina panjang lk 1,5 cm, hijau, bakal buah beruang 1. Buah berupa buni, bulat telur terbalik memanjang, merah oranye, panjang lk 6 cm, dinding buah berserabut. Biji satu, berbentuk bulat telur, ada gambaran seperti jala.

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

2. Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

Biji pinang diambil secara acak pada bulan November 2017 di daerah Mojosongo, Surakarta. Pembuatan serbuk biji pinang dilakukan dengan cara biji pinang dicuci bersih pada air mengalir agar terbebas dari kotoran dan debu,

kemudian dipisahkan kulit dan biji buah kemudian biji buah pinang dipotong kecil-kecil dan kemudian dikeringkan pada oven dengan suhu 40°C dan diserbuk dengan ayakan nomor 40. Pengeringan bahan dilakukan bertujuan untuk mengurangi kadar air serta mencegah tumbuhnya jamur dan mikroorganisme lain yang dapat menyebabkan pembusukan dan mencegah perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu. Pemakaian ayakan nomor 40 bertujuan agar serbuk dari biji pinang (*Areca catechu* L.) dapat tersaring secara optimal. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada tabel 1. Biji pinang sebanyak 5500 gram bobot basah kemudian dikeringkan dan didapat bobot kering 1970 gram, diperoleh rendemen bobot kering terhadap bobot basah adalah 35,81%.

Tabel 1. Presentase bobot kering terhadap bobot basah biji pinang

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

Perhitungan persentase bobot basah terhadap bobot kering dapat dilihat pada lampiran 10.

3. Hasil penetapan kadar kelembaban serbuk

Penetapan kadar kelembaban serbuk biji pinang (*Areca catechu* L.) menggunakan alat *moisture balance*. Hasil penetapan kadar kelembaban tercantum dalam tabel dibawah ini :

Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab biji pinang

| No | Bobot serbuk (gram) | Kadar lembab (%) |
|-------------------|----------------------------|-------------------------|
| 1 | 2,04 | 6,7 |
| 2 | 2,09 | 5,5 |
| 3 | 2,05 | 7,1 |
| Rata- rata | | 6,4 |

Berdasarkan tabel 2 hasil perhitungan kadar kelembaban serbuk biji pinang (*Areca catechu* L.) yang dilakukan 3 replikasi, dapat disimpulkan persentase kadar kelembaban 6,4%. Penetapan kadar kelembaban tidak boleh lebih dari 10%. Kadar kelembaban yang kurang dari 10% dapat mencegah pertumbuhan kapang dan aktivitas enzim sehingga bahan lebih awet dan kandungan zat aktif tidak berkurang (Katno *et al.* 2008). Penetapan kadar air perlu dilakukan karena air merupakan media tumbuhnya jamur, kapang, dan mikroorganisme lain yang dapat merusak simplisia. Reaksi enzimatik dengan adanya air menurunkan mutu serbuk.

4. Hasil pembuatan ekstrak biji pinang

Pembuatan ekstrak biji pinang menggunakan metode maserasi. Metode maserasi merupakan metode paling sederhana. Metode maserasi tidak menggunakan pemanasan sehingga kandungan kimia yang tidak tahan panas seperti flavonoid tetap ada didalam ekstrak biji pinang. Keuntungan lain dari cara penyarian dengan metode maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Hasil ekstrak kental biji pinang (*Areca catechu* L.) yang didapat sebesar 562,6 gram dari bobot serbuk 1200 gram.

5. Hasil penetapan % rendemen ekstrak

Hasil penetapan % rendemen didapat dari hasil ekstrak pekat dibagi dengan berat serbuk biji pinang kemudian dikalikan 100%. Hasil rendemen ekstrak maserasi biji pinang yang diperoleh adalah 46,8%.

Tabel 3. Hasil penetapan % rendemen ekstrak

| Bobot serbuk (gram) | Bobot ekstrak kental (gram) | Rendemen (% b/b) |
|----------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| 1200 | 562,6 | 46,8 |

Data tabel 3 menunjukkan bahwa nilai % rendemen yang didapat sebesar 46,8% artinya bahwa senyawa yang dapat tersari sebanyak 46,8%. Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 11.

6. Hasil pengujian bebas etanol

Hasil pengujian bebas etanol dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji bebas etanol ekstrak biji pinang

| Hasil | Pustaka |
|-------------------------|-------------------------|
| Tidak tercium bau ester | Tidak tercium bau ester |

Hasil uji bebas etanol menunjukkan bahwa ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) positif bebas etanol karena tidak tercium bau ester yang khas etanol. Uji bebas etanol dilakukan pada ekstrak hasil maserasi yang bertujuan untuk mencegah kesalahan dalam pengamatan karena etanol dapat bersifat sebagai antibakteri sehingga saat dilakukan uji antibakteri bukan etanol yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri melainkan ekstrak biji pinang yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

7. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pinang

Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dari alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) yang dapat dilihat pada tabel 5 sebagai berikut :

Tabel 5. Identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pinang

| No. | Identifikasi senyawa metabolit sekunder | Pereaksi | Pustaka | Hasil | Ket hasil |
|-----|---|--|---|---|-----------|
| 1. | Alkaloid | Tabung 1 → Mayer Tabung 2 → Dragendroff | Tabung 1 ditambah dengan reagen mayer terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan. Tabung 2 ditambah reagen Dragendroff terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Setyowati 2014) | Tabung 1 → Endapan putih kekuningan Tabung 2 → merah hingga jingga | + |
| 2. | Flavonoid | Mg + HCL pekat | Lapisan merah atau kuning atau jingga pada amil alkohol (Setyowati 2014) | Merah pada lapisan amil alkohol | + |
| 3. | Saponin | Air + HCL 2N | Berbusa (Ramyashree <i>et al.</i> 2012) | Terbentuk busa setelah ditambahkan HCL 2N | + |
| 4. | Tanin | Air + FeCl ₃ 1% | Endapan hijau kehitaman (Setyowati 2014) | Endapan hijau kehitaman | + |

Hasil gambar identifikasi senyawa kimia ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) dapat dilihat pada lampiran 5. Identifikasi kandungan kimia terhadap ekstrak biji pinang dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam biji pinang dengan menggunakan tabung reaksi. Berdasarkan tabel 5 dapat dilihat bahwa hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pinang positif mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin yang diperkirakan mempunyai aktivitas antibakteri.

8. Hasil fraksinasi

Fraksinasi merupakan cara pemisahan golongan utama kandungan yang satu golongan utama yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu

tanaman. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan menjadi fraksi yang berbeda menurut sifat pelarut yang digunakan.

Hasil sediaan ekstrak maserasi biji pinang (*Areca catechu* L.) yang telah didapatkan ditimbang kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut non polar (*n*-heksana), difraksinasi 3 kali dengan pelarut *n*-heksana masing-masing 75 mL, kemudian fraksi *n*-heksana yang didapat diuapkan dengan *rotary evaporatory* pada suhu 55°C dan selanjutnya dikentalkan dengan oven pada suhu 60°C. Residu dari *n*-heksana dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan pelarut semi polar (etil asetat). Residu dari fraksinasi *n*-heksana difraksi 3 kali dengan pelarut etil asetat masing-masing 75 mL. Fraksi yang didapatkan diuapkan dengan *rotary evaporatory* pada suhu 55°C kemudian dikentalkan dengan oven pada suhu 60°C. fraksi air didapatkan dari residu fraksi etil asetat dilanjutkan dengan pemekatan dengan waterbatch selama ± 24 jam sehingga didapat fraksi air. Hasil rendemen fraksinasi biji pinang dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil fraksinasi biji pinang (*Areca catechu* L.)

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

Berdasarkan tabel 6 hasil rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yang diperoleh yaitu 1,17%, 5,95% dan 18,17%. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dapat dilihat pada lampiran 12. Fraksi *n*-heksana dapat melarutkan senyawa non polar, fraksi etil asetat dapat melarutkan senyawa semi polar sedangkan fraksi air dapat melarutkan senyawa polar. Berdasarkan hasil rendemen yang fraksi air yang di paling banyak dibanding dengan fraksi yang lain karena senyawa yang terkandung dalam biji pinang kebanyakan bersifat polar. Dan hasil rendemen fraksi *n*-heksana sangat kecil hal tersebut disebabkan pada proses fraksinasi pada pelarut *n*-heksana mengalami emulsi sehingga fraksi tidak dapat digunakan, fraksi yang mengalami emulsi seharusnya ditimbang dan dihitung % rendemennya tetapi pada penelitian dibuang dan tidak ditimbang sehingga % rendemen yang diperoleh sedikit.

9. Hasil pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dalam biakan murni diambil masing-masing 1-2 ose dan kemudian dimasukkan tabung yang telah diisi 10 mL media BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri disetarakan dahulu dengan standar *Mc farland* 0,5 dalam medium BHI (*Brain Heart Infusion*) yang memiliki perbandingan 1:1000. Standart *Mc farland* 0,5 bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah sel bakteri.

10. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

10.1. Hasil identifikasi bakteri uji berdasarkan koloni. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasi pada medium *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA) dengan cara cawan petri dibagi menjadi 4 sektor. Sektor 1 merupakan tempat mula-mula meletakkan inokulasi dengan lup inokulasi, sektor 2 merupakan pengenceran pertama garis-garis goresan pada sektor 1 hendaknya saling terpisah, sektor 3 merupakan usaha pengenceran kedua dan sektor 4 merupakan usaha pengenceran terakhir kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C dengan penampakan koloni yang berwarna hijau yang dihasilkan enzim *pyoverdin*, koloni berbentuk bulat dan halus. Hasil isolasi bakteri dapat dilihat pada lampiran 6 gambar 18.

10.2. Hasil identifikasi bakteri uji dengan pewarnaan gram. Hasil identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan pewarnaan gram adalah bakteri dengan berbentuk batang, berwarna merah yang dikarenakan kehilangan warna kristal violet ketika dicuci dengan alkohol dan sewaktu diberi warna merah safranin tampak berwarna merah yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan gram negatif, sedangkan gram positif adalah bakteri pada pengecatan tahan terhadap alkohol, sehingga tetap mempertahankan zat ara kristal violet sehingga tampak biru atau ungu tua. Perbedaan warna bakteri gram negatif dan gram positif dikarenakan bakteri gram positif mempunyai kandungan peptidoglikan dinding selnya lebih banyak daripada lipid dan sebaliknya pada

bakteri gram negatif mempunyai lipid dinding sel yang lebih banyak daripada peptidoglikan (Kusnadi 2009). Hasil pengecatan gram dapat dilihat di lampiran 6 gambar 19.

10.3. Hasil identifikasi bakteri uji secara biokimia. Hasil identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara biokimia dapat dilihat tabel 7 dan gambar 20.

Tabel 7. Hasil identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* atcc 27853

| Media | Hasil | Pustaka |
|--------|-------|---------|
| KIA | K/KS- | K/KS- |
| SIM | --+ | --+ |
| LIA | K/KS- | K/KS- |
| Citrat | + | + |

Keterangan :

| | | | |
|-----|-----------------------------|-------|---|
| SIM | : <i>Sulfida Indol Agar</i> | K | : merah (pada media KIA) |
| KIA | : <i>Kliger Iron Agar</i> | A | : terbentuk warna kuning |
| LIA | : <i>Lysine Iron Agar</i> | K | : terbentuk warna ungu (pada media LIA) |
| | | S (-) | : tidak terbentuk warna hitam |

Hasil pengujian dengan media KIA (*Kliger's Iron Agar*) memberikan hasil K/KS-, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak memfermentasi glukosa dan laktosa. S- artinya uji H₂S negatif ditunjukkan tidak adanya pembentukan warna hitam karena bakteri tidak dapat mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S. H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media KIA.

Hasil pengujian dengan media SIM (*Sulfida Indol Motility*) memberikan hasil --+, artinya uji H₂S negatif ditandai dengan tidak adanya pembentukan warna hitam pada media SIM. Uji indol negatif setelah penambahan 5 tetes reagen Erlich A dan B media tidak berwarna merah muda dipermukaan berarti tidak membentuk indol dari tryptopan sebagai sumber karbon. Uji motilitas positif ditunjukkan dengan adanya penyebaran pertumbuhan bakteri pada media SIM.

Hasil pengujian dengan metode LIA (*Lysin Iron Agar*) memberikan hasil K/KS- artinya bagian dasar dan lereng berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarbosilasi lisin. S- artinya uji H₂S negatif menunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA.

Hasil pengujian pada media citrat memberikan hasil positif yang ditandai warna biru pada media citrat, hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan citrat sebagai sumber karbon.

11. Hasil pengujian aktivitas antibakteri

11.1. Hasil secara metode difusi. Fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air yang didapat dari ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Masing-masing sediaan dibuat dalam 3 konsentrasi yaitu 50%, 25%, 12,5%. Perhitungan pembuatan larutan dengan berbagai konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 15. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5% kemudian kontrol positif adalah ciprofloksasin. Hasil uji dengan metode difusi dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Diameter zona hambat pada uji antibakteri biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara difusi

| Sampel | Konsentrasi | Diameter hambat (mm) | | | Rata-rata ± SD |
|-------------------|-------------|----------------------|----|----|---------------------------|
| | | Replikasi | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | |
| Kontrol (+) | | 30 | 31 | 32 | 31,00 ± 1,00 ^g |
| Kontrol (-) | 5% | 0 | 0 | 0 | 0,00 ± 0,00 ^a |
| <i>n</i> -heksana | 50% | 6 | 7 | 6 | 6,33 ± 0,58 ^b |
| Etil asetat | 50% | 12 | 13 | 14 | 13,00 ± 1,00 ^f |
| Air | 50% | 9 | 10 | 9 | 9,33 ± 0,58 ^d |
| Ekstrak | 50% | 11 | 10 | 8 | 9,67 ± 1,53 ^e |
| <i>n</i> -heksana | 25% | 9 | 7 | 10 | 8,67 ± 1,53 ^d |
| Etil asetat | 25% | 19 | 17 | 14 | 16,67 ± 2,52 ^f |
| Air | 25% | 13 | 13 | 11 | 12,33 ± 1,15 ^f |
| Ekstrak | 25% | 10 | 12 | 11 | 11,00 ± 1,00 ^e |
| <i>n</i> -heksana | 12,5% | 7 | 7 | 8 | 7,33 ± 0,58 ^c |
| Etil asetat | 12,5% | 15 | 15 | 12 | 14,00 ± 1,73 ^f |
| Air | 12,5% | 10 | 14 | 9 | 11,00 ± 2,65 ^e |
| Ekstrak | 12,5% | 13 | 12 | 9 | 11,33 ± 2,08 ^e |

^{abcdefg} : ada perbedaan yang sig > 0,005

Berdasarkan data pada tabel 8 dianalisis menggunakan *One-Sample Kormogorov Smirnov* dan memberikan hasil data normal yang kemudian diuji dengan *One-way Anova* dengan hasil between groups > 0,05 yang berarti H_0 diterima dan ada perbedaan yang signifikan antara sub fraksi dan ekstrak biji pinang. Hasil uji *One-Sampel Kormogorov Smirnov* menunjukkan bahwa nilai signifikannya sebesar 0,09 > 0,05 sehingga dapat disimpulkan daya hambat yang

diperoleh terdistribusi secara normal maka dapat dilakukan *Analisis of Varian* (ANNOVA) one-way. Untuk uji kesamaan varian dilakukan dengan uji test homogeneity of variances pada kolom levene statistic menunjukkan bahwa signifikasinya adalah $0,000 < 0,05$ maka H_0 tidak diterima artinya tiap sampel mempunyai perbedaan yang signifikan. Hasil signifikansi uji ANNOVA oneway tabel diameter hambat yaitu nilai $F = 64,161$ dengan probabilitas $0,000 < 0,05$ yang berarti dari keempat sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Berbeda dengan hasil tabel *Homogeneous Subsets* pada subsets 6 yang terdiri dari (air 25%, etil asetat 50%, etil asetat 12,5% dan etil asetat 25%) dapat diketahui bahwa air berada pada 1 subsets dengan etil asetat yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan, hal tersebut dikarenakan fraksi air mengandung senyawa yang tidak dapat ditarik oleh pelarut *n*-heksana dan etil asetat yang diduga memiliki aktivitas antibakteri. Kandungan senyawa tersebut menyebabkan diameter hambat fraksi air mendekati fraksi etil asetat dan kepekaan fraksi mempengaruhi zat aktif dari fraksi air terdifusi ke dalam media untuk melakukan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sehingga fraksi air konsentrasi 25% memiliki diameter hambat mendekati fraksi etil asetat. Hasil analisis dapat dilihat pada lampiran 16.

Data di atas menunjukkan bahwa kontrol positif dan keempat sediaan (ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air) memiliki daya hambat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, berbeda dengan kontrol negatif (DMSO 5%) tidak memiliki daya hambat. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kontrol yang digunakan tidak berpengaruh pada uji bakteri. Fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri paling efektif dan merupakan fraksi teraktif dalam menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Fraksi etil asetat mempunyai daya hambat yang paling besar jika dibandingkan dengan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, dan fraksi air karena pelarut dari fraksi etil asetat mampu menarik senyawa aktif yang terkandung dalam biji pinang (*Areca catechu* L.). Penghambatan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* oleh fraksi etil asetat disebabkan karena senyawa aktif yang terdapat dalam fraksi etil asetat seperti flavonoid dan tanin yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Flavonoid sebagai antibakteri

dapat menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri dan mampu menghambat motilitas bakteri (Sabir 2008). Tanin bekerja dengan cara mempresipitasi protein melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Dewanti & Wahyudi 2011).

Pada tabel 9 dapat dilihat bahwa daya hambat fraksi etil asetat dengan konsentrasi 25% (16,67 mm) lebih besar dibanding dengan konsentrasi 50% (13,00 mm) dan konsentrasi 12,5% (14,00 mm). Pada umumnya, peningkatan zona hambat sebanding dengan peningkatan konsentrasi fraksi. Tetapi ada penurunan zona hambat pada konsentrasi yang lebih besar, hal tersebut dikarenakan kepekatan fraksi yang berpengaruh terhadap kecepatan dan kemampuan untuk berdifusi dari senyawa antibakteri ke dalam media agar pertumbuhan bakteri.

11.2. Hasil secara metode dilusi. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) yaitu fraksi etil asetat dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan metode dilusi untuk mengetahui nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum).

Tabel 9. Hasil uji aktivitas antibakteri secara dilusi

| Konsentrasi | Fraksi etil asetat | | |
|-------------|--------------------|----|-----|
| | I | II | III |
| Kontrol (-) | - | - | - |
| 50% | - | - | - |
| 25% | - | - | - |
| 12,5% | - | - | - |
| 6,25% | + | + | + |
| 3,12% | + | + | + |
| 1,56% | + | + | + |
| 0,78% | + | + | + |
| 0,39% | + | + | + |
| 0,19% | + | + | + |
| 0,09% | + | + | + |
| Kontrol (+) | + | + | + |

Keterangan :

(-) : tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-) : fraksi etil asetat

Kontrol (+) : suspensi bakteri

Berdasarkan data tabel 9 terlihat bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785, nilai KHM

(Konsentrasi Hambat Minimum) tidak dapat atau sulit diamati dikarenakan warna sampel yang digunakan keruh, sehingga dilanjutkan dengan penggosokan pada media PSA untuk melihat KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum), didapat nilai KBM 12,5% artinya bahwa pada konsentrasi 12,5% fraksi etil asetat dapat membunuh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hal ini dapat disebabkan bahwa kandungan senyawa dari biji pinang (*Areca catechu* L.) dapat ditarik oleh pelarut etil asetat karena pelarut etil asetat bersifat semi polar sehingga senyawa seperti flavonoid dan tanin terdapat didalam fraksi etil asetat. Metode dilusi bermanfaat untuk mengetahui dosis terkecil obat untuk menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) ditentukan pada medium PSA (*Pseudomonas Selektif Agar*) dengan konsentrasi minimal 12,5% tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

12. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dilakukan hanya pada fraksi teraktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yaitu fraksi etil asetat. Tujuan dilakukan KLT yaitu untuk mengetahui beberapa senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara efektif. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 10 dan gambar hasil pengujian dapat dilihat pada lampiran 11.

Tabel 10. Hasil uji KLT dari fraksi etil asetat biji pinang (*Areca catechu* L.)

| Senyawa | F. Gerak | Pereaksi semprot | Hasil setelah disemprot | | Nilai Rf | | Ket Hasil |
|-----------|--------------------------|------------------|-------------------------|---------------------|----------|------------------|-----------------|
| | | | UV 254 | UV 366 | Sampel | Baku | |
| Alkaloid | Kloroform :etanol (96:4) | Dragendroff | Coklat kehitaman | hijau | 0,24 | 0,85 (rutin) | - |
| Flavonoid | Kloroform: metanol (2:3) | Sitoborat | Peredaman | Berwarna ungu gelap | 0,86 | 0,84 (kuersetin) | + |
| Tanin | Metanol:aq uadest (6:4) | FeCl 5% | Berwarna hitam | Berwarna hitam | 0,88 | - | +(Eraputu 2017) |

Hasil data tabel 10 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa flavonoid dan tanin sebagai senyawa antibakteri yang dapat menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa flavonoid pada UV₂₅₄ memberikan peredaman dan pada UV₃₆₆ memberikan warna ungu gelap. Nilai Rf sampel 0,86 yang hampir sama dengan pembanding kuersetin adalah 0,84. Senyawa flavonoid akan terlihat bercak yang berfluoresensi biru, kuning dan ungu gelap (Harborne 1987), sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol biji pinang positif mengandung flavonoid dari bercak pada lempeng KLT yang dilihat pada UV₂₅₄, UV₃₆₆, pereaksi semprot dan nilai Rf yang hampir sama dengan pembanding kuersetin. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan menghambat pembentukan senyawa kompleks pada protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel.

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa tanin pada UV₂₅₄ berwarna hitam dan pada UV₃₆₆ berwarna hitam. Nilai Rf sampel 0,88 (Era putu 2017). Tanin memiliki peran sebagai antibakteri dengan cara mempresipitasi protein melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan inaktivasi fungsi materi genetik (Dewanti & Wahyudi 2011).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari biji pinang (*Areca catechu* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dalam menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ketiga, fraksi etil asetat mempunyai KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) 12,5% terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

B. SARAN

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

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

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2013. *Farmakope Indonesia edisi V*. Jakarta : Kemetrian Kesehatan RI. Halaman : 166-167.
- Arifianti L, Oktarina RD, Kusumawati I. 2014. Pengaruh jenis pelarut pengekstraksi terhadap kadar sinensetin dalam ekstrak daun *Orthosiphon stamineus* benth. *E-Journal Planta Husada* 2:1-4.
- [Departemen Kesehatan RI]. 1979. *Materia Medika*. Jilid III. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 11.
- [Departemen Kesehatan RI]. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Departemen Kesehatan RI]. 1989. *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. p. 55-58.
- [Departemen Kesehatan RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 3-11.
- Ajizah A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap ekstrak daun *Psidium Guajava* L. *Bioscientiae* 2:31-38.
- Ayuningtyas AK. 2008. Efektivitas campuran meniran *Phyllanthus niruri* dan bawang putih *allium sativum* untuk pengendalian infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele dumbo *Clarias gariepenus*. [Skripsi]. Bogor: Prodi Teknologi dan Manjemen Akuakultur, Institut Pertanian Bogor.
- Bamford KB, Gillespie SH. 2007. *At a Glance Mikrobiologi Medis dan Infeksi*. Ed ke-3. Jakarta : Erlangga. Hlm 56-57.
- Bauman R. 2007. *Microbiology With Disaese By Taxonomy*. Ed ke-2. San Fransisco : Person Educating Inc.
- Bonang G dan Koeswardono.1982. *Mikrobiologi Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: PT Gramedia. hlm 77-78, 176-191.
- Budiman H, Rahmawati F, Sanjaya F. 2010. Isolasi dan identifikasi alkaloid pada biji kopi robusta (*Coffea robusta* Lindl. Ex De Will) dengan cara kromatografi lapis tipis. *CERATA Jurnal Ilmu Farmasi (Journal of Pharmacy Science)* 1:57-58.
- Caesar H dkk. 2014. Uji daya hambat ekstrak etanol biji pinang yaki (*areca vestiaria*) terhadap bakteri *Stapyhlococcus aureus*, *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa. Jurnal Ilmiah Farmasi-unsat volume 6 nomer 1. Fakultas MIPA, unsat, Manado.2017

Dalimartha S. 2005. *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Diabetes Melitus*. Bogor : Penebar swadaya

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

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

Dianasari N. 2009. Uji aktivitas ekstrak etanol kayu secang (*caesalpinia sappan* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan shigella dysentri serta bioautografi [skripsi]. Hal 11-12.

Fitri H, dkk. 2016. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca Catechu* L.) Terhadap Penyembuhan Luka Bakar Pada Kulit Punggung Mencit Putih Jantan (*Mus Muculus*). *Jurnal ilmiah manuntung* 2(2), 154-160.

Goodman & Gilman. 2010. *Dasar Farmakologi Terapi*. editor Joel G, Hardman, Lee E. Limbird. Edisi 10. Jakarta, EGC, Hal.681

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

Hanani E. 2014. *Analisis Fitokimia*. Buku Kedokteran.EGC

Harbone JB. 1987. *Metode Fitokimia. ED II. Kosasi Patmawinata dan iwang sudiro*, penerjemah ; Bandung : ITB.

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

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1986. *Review of Medical Mikrobiology*. Ed ke 16, penerjemah; bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jakarta, Penerbit Salemba Medika.

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Ed ke 16, penerjemah; Gerard Bonang. Jakarta: EGC. hlm 239, 241-243.

Jawetz E, Melnick J.L, Adelberg E.A. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.

- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 25*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. hlm 230-231.
- Katzung, B.G. 2007. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Ed ke-5. Dripa Sjabana, penerjemah; Jakarta : EGC. Terjemahan dari : *basic and clinical pharmacology*. Hlm 779-787, 857.
- Lenny. S. 2006. "Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida, Alkaloid". Skripsi. USU Repository
- Katno, Kusumadewi AW, Sutjipto. 2008. Pengaruh waktu pengeringan terhadap kadar tanin daun jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.). *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia* 1: 38-46.
- Kurniawati E. 2015. Daya antibakteri ekstrak etanol tunas bambu apus terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Jurnal Wiyata* 2: 83-90.
- Kusnadi, Soni, Muhsinin, Yayan Sanjana. 2009. Buku Saku Biologi. SMA Jakarta:Kawan Pustaka.
- Marliana SD, Suryanti V, Suyono. 2005. Skrining fitokimia dan analisis Kromatografi Lapis Tipis komponen kimia buah labu siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam ekstrak etanol. *Biofarmasi* 3:26-31.
- Mayasari E. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* : Karakteristik, Infeksi dan Penggunaan.<http://library.usu.ac.id>. [24 Desember 2014.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan* 7:361-367.
- Muhtadi, dkk. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Kulit Batang Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn.) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis* beserta bioautografinya. *Biomedika* Volume 4 Nomer 2. Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Nony P. 2013. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Perdina Nursidika, dkk. 2014. Aktivitas Antimikroba Fraksi Ekstrak Etanol Buah Pinang (*Areca catechu* L.) pada Bakteri *Merhicillin Resisteant staphylococcus aureus*. *MKB, volume 46 No.2*.

- Pleczar MJ, Chan ECS. 1998. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jilid 2. Hadioetomo RS, Imam T, angka SL, penerjemah; Jakarta: UI-Press. Terjemahan dari : *Element of Microbiology*.
- Power DA, Mc Cuen PJ. 1988. *Manual BBI. Product and Laboratory Procedures Sixth Edition*. Maryland: Becton Dickinson.
- Pratiwi, Sylvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta : Erlangga. Hlm 188.
- Putra ABW. 2010. Uji aktivitas antibakteri ekstrak kloroform kelopak Roselia (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* uji bioautografi [skripsi]. Surakarta : Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Putri WS, Warditiani NK, Larasanty LPF. 2013. Skrining fitokimia ekstrak etil asetat kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) Bali: Universitas Udayana. hlm 56-60.
- Putu ESKY, dkk. 2017. Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Tanaman Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L.). Akademi Farmasi Saraswati Denpasar : *Medicamento vol 3*.
- Radji. M. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Buku Kedokteran EGC, Jakarta . 7, 21-24, 27-32.
- Ramyashree M, Krishna Ram H, Shivabasavaiah. 2012. Ethnomedicinal value of opuntia elatior fruits and its effects in mice. University of Mysore. Karnataka. India. *Journal of Pharmacy Research* 8: 4554-4558.
- Sabir, A. 2008. In Vitro Antibacterial Activity Of Flavonoids Trigona Sp Propolis Against Streptococcus Mutans. Terdapat pada <http://www.journal.unair.ac.id/filerPDF/DENTJ-383-08.pdf>. Diakses pada tanggal 16 Maret 2011
- Setyowati WAE, dkk. 2014. Skrining fitokimia dan identifikasi komponen utama ekstrak metanol kulit durian (*Durio zibethinus* Murr.) varietas petruk. Surakarta. *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI*.
- Suharto MAP, Edy HJ, Dumanauw JM. 2012. Isolasi dan identifikasi senyawa saponin dari ekstrak metanolbatang pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* L.). *Pharmacon* 1: 89.
- Sumarsih S. 2003. *Mikrobiologi Dasar*. Yogyakarta : Universitas Pembangunan Nasional Veteran.
- Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Papas Sinar Sinanti, Jakarta

- Syamsuhidayat SS dan Hutapea JR. 2001. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Jilid I. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hlm 305-306.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. 2011. Phytochemical screening and extractoin. *Internationale Pharmaceutica Sciecia* 1:98-106.
- Waluyo L. 2004. Mikrobiologi Umum. Edisi Pertama. Universitas Muhammadiyah Malang : UMM Press. Hal 197-198.
- Wardhani LK dan Sulistyani N. 2012. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* beserta profil Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 2:1-1

Lampiran 1. Determinasi tanaman pinang (*Areca catechu* L.)


UPT- LABORATORIUM

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

Menerangkan bahwa :

Nama : Elizabeth Dian K
NIM : 20144136 A
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

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

Deskripsi :

Habitus : Pohon, sampai tinggi 25 m.
Batang : Tidak bercabang, langsing, besar lk 15 cm, tajuk tidak rimbun.
Daun : Pelepah daun berbentuk tabung, panjang lk 79 cm; tangkai daun pendek; anak daun 78 cm, lebar lk 5cm, ujung sobek dan bergigi.
Bunga : Tongkol bunga dengan seludang (spatha) yang panjang dan mudah rontok, muncul di bawah daun, panjang lk 75 cm, dengan tangkai pendek bercabang rangkap, sumbu ujung sampai panjang 35 cm, dengan 1 bunga betina pada pangkal, di atasnya dengan banyak bunga jantan tersusun dalam 2 baris yang tertancap dalam alur. Bunga jantan panjang 4 mm, putih kuning, benangsari 6. Bunga betina panjang lk 1,5 cm, hijau, bakal buah beruang 1.
Buah : Buni, bulat telur terbalik memanjang, merah oranye, panjang lk 6 cm, dinding buah berserabut.
Biji : **Satu, berbentuk bulat telur, ada gambaran seperti jala.**

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

Surakarta, 19 Maret 2018
Indeterminasi

Dra. Iswatinah Wirjosoendjojo, SU



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

Lampiran 2. Tanaman pinang (*Areca catechu* L.)



Gambar 1. Tanaman pinang



Gambar 2. Biji buah pinang



Gambar 3. Serbuk biji buah pinang

Lampiran 3. Ekstrak dan fraksi biji pinang



Gambar 4. Ekstrak kental biji pinang



Gambar 5. Fraksinasi *n*-heksana



Gambar 6. Fraksinasi etil asetat

Lampiran 4. Alat penelitian



Gambar 7. Moisture balance



Gambar 8. Oven



Gambar 9. Rotary evaporatory



Gambar 10. Vortex



Gambar 11. Inkubator

Lampiran 5. Uji bebas etanol dan identifikasi kandungan kimia biji pinang (*Areca catechu* L.)



Gambar 12. Uji bebas etanol flavonoid



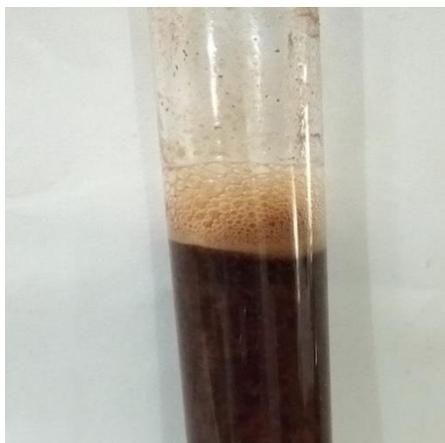
Gambar 13. Identifikasi flavonoid



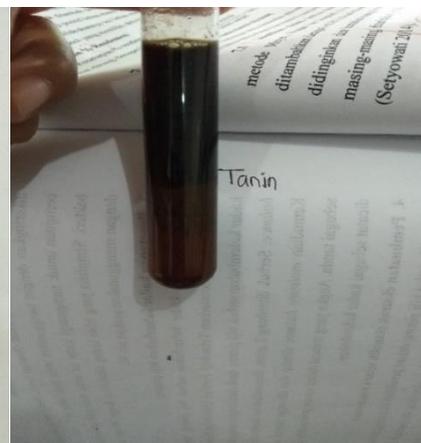
Gambar 14. Identifikasi alkaloid (Mayer)



Gambar 15. Identifikasi alkaloid (Dragendroff)



Gambar 16. Identifikasi saponin

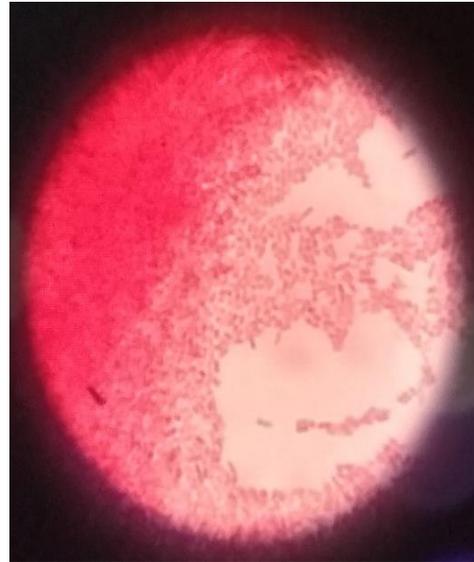


Gambar 17. Identifikasi tanin

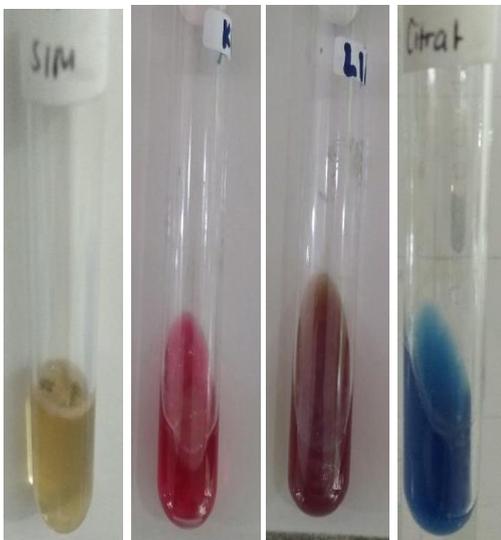
Lampiran 6. Identifikasi bakteri uji dan suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Gambar 18. Identifikasi pada media PSA



Gambar 19. Uji pewarnaan gram

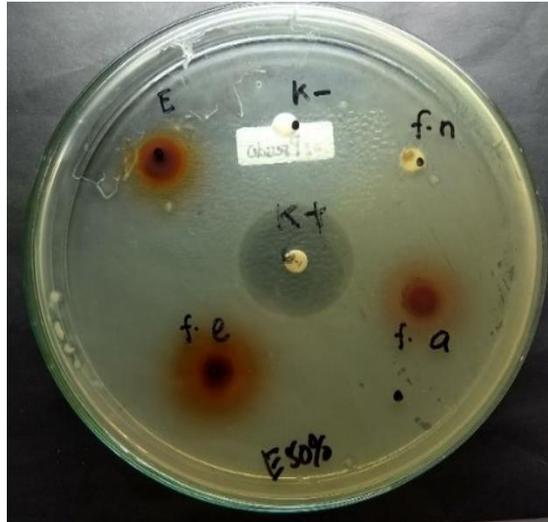


Gambar 20. Uji biokimia



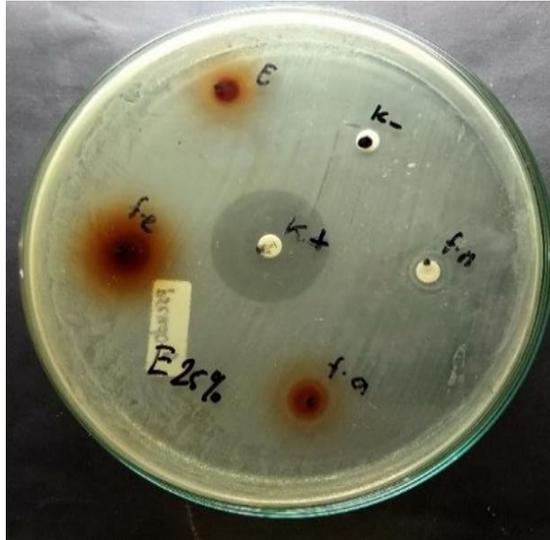
Gambar 21. Suspensi bakteri yang distandarisasi dengan *Mc Farland* 0,5

Lampiran 7. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air bji pinang (*Areca catechu* L.) secara difusi konsentrasi 50%



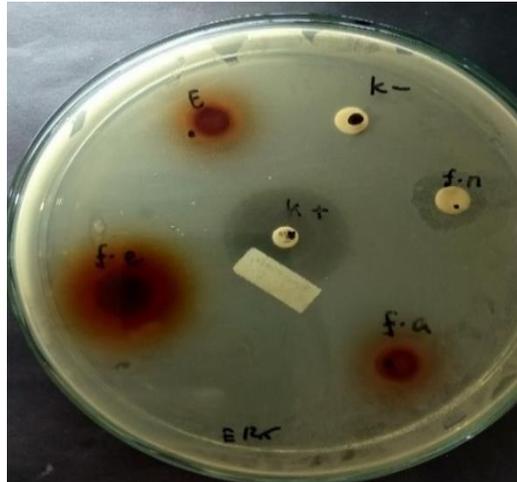
Gambar 22. Inokulasi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, air, Ciprofloksasin, dan DMSO 5% terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 konsentrasi 12,5%

Lampiran 8. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air biji pinang (*Areca catechu* L.) secara difusi konsentrasi 25%



Gambar 23. Inokulasi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, air, Ciprofloksasin, dan DMSO 5% terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 konsentrasi 25%

Lampiran 9. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air biji pinang (*Areca catechu* L.) secara difusi konsentrasi 12,5%



Gambar 24. Inokulasi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, air, Ciprofloksasin, dan DMSO 5% terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 konsentrasi 50%

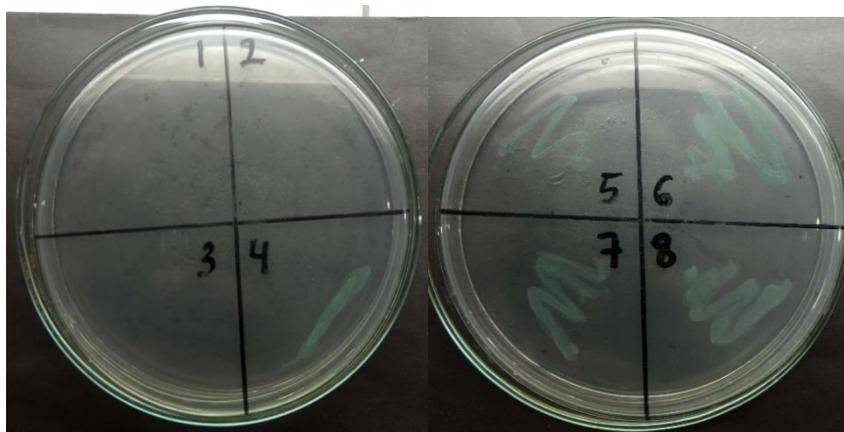
Keterangan :

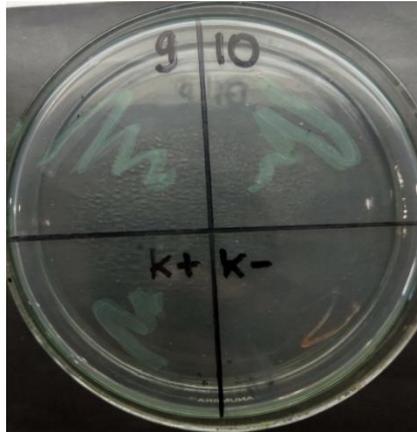
- E** : Ekstrak
- F.n** : Fraksi *n*-heksana
- F.e** : Fraksi etil asetat
- F.a** : Fraksi air
- K+** : Kontrol positif (Ciprofloksasin)
- K-** : Kontrol negatif (DMSO 5%)

Lampiran 10. Gambar hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat biji pinang (*Areca catechu* L.) secara dilusi



Gambar 25. Pengenceran fraksi teraktif etil asetat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara dilusi





Gambar 26. Inokulasi fraksi teraktif etil asetat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada media PSA

Keterangan :

- 1. Konsentrasi 50%**
- 2. Konsentrasi 25%**
- 3. Konsentrasi 12,5%**
- 4. Konsentrasi 6,25%**
- 5. Konsentrasi 3,125%**
- 6. Konsentrasi 1,56%**
- 7. Konsentrasi 0,78%**
- 8. Konsentrasi 0,39%**
- 9. Konsentrasi 0,195%**
- 10. Konsentrasi 0,097%**

K+ : suspensi bakteri

K- : BHI

Lampiran 11. Hasil uji KLT fraksi teraktif etil asetat dan perhitungan Rf

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

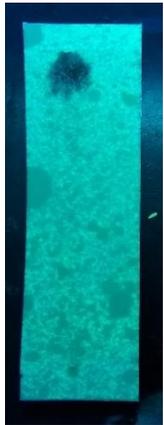
| UV ₂₅₄ | UV ₃₆₆ | Sitroborat |
|---|---|---|
|  |  |  |
| S P | S P | S P |

Keterangan :

S :Sampel

P :Pembanding (kuersetin)

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

| UV ₂₅₄ | UV ₃₆₆ | FeCl ₃ 5% |
|---|---|---|
|  |  |  |
| S | S | S |

Keterangan: :

S : Sampel

3. Perhitungan Rf

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

a. Flavonoid

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

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

b. Tanin

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

Lampiran 12. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah

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

Perhitungan bobot kering terhadap bobot basah adalah:

$$\begin{aligned}\% \text{ bobot kering} &= \frac{\text{Bobot kering (g)}}{\text{Bobot basah (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{1970(\text{g})}{5500 (\text{g})} \times 100\% \\ &= 35,81\%\end{aligned}$$

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

Lampiran 13. Hasil perhitungan rendemen ekstrak etanol biji pinang (*Areca cathcu L.*) secara maserasi

| Bobot serbuk () | Bobot ekstrak () | Rendemen (% b/b) |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1200 | 562,647 | 46,8 |

$$\begin{aligned}\text{Rendemen ekstrak etanol} &= \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{562,647 \text{ g}}{1200 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 46,8\%\end{aligned}$$

**Lampiran 14. Perhitungan rendemen fraksi *n*-heksanaa, etil asetat, dan air
dari biji pinang (*Areca cathcu L.*)**

Hasil fraksinasi ekstrak biji pinang

| Pelarut | Bobot ekstrak (g) | Bobot fraksi (g) | Rendemen (%b/b) |
|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| <i>n</i> -heksanaa | 115 | 1,35 | 1,17 |
| Etil asetat | 115 | 6,85 | 5,95 |
| Air | 115 | 20,89 | 18,17 |

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

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

$$= 1,17\%$$

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

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

$$= 5,95\%$$

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

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

$$= 18,17\%$$

Lampiran 15. Pembuatan larutan dengan berbagai konsentrasi untuk metode difusi

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

Lampiran 16. Pembuatan larutan dengan berbagai konsentrasi metode difusi

Fraksi etil asetat

Pembuatan konsentrasi 50%

Ditimbang 1 ekstrak dan fraksi dimasukkan ke dalam vial

kemudian tambahkan DMSO 5% ad 2 mL

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

Keterangan :

Tabung 1 = Kontrol (-)

Tabung 3 = Konsentrasi 25%

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

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

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

$$V1 = 0,5$$

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

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

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

Lampiran 17. Formulasi dan pembuatan media

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

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

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

2. Formulasi dan pembuatan *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA)

| | |
|--------------------|---------|
| Gelatin pepton | 16,0 |
| Casein hydrolysate | 10,0 |
| Potassium sulphate | 10,0 |
| Magnesium chloride | 1,40 |
| Agar | 11,0 |
| pH | 7,1 |
| Aquadest | 1000 mL |

Semua bahan dilarutkan dalam aquadestilata sebanyak 1000 mL dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian ditambahkan gliserin dituang pada tabung reaksi disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

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

| | |
|--------------------------------|---------|
| Beef, dehydrated infusion from | 300,0 |
| Casein hydrolysate | 17,5 |
| Starch | 1,5 |
| Agar-agar | 17,0 |
| Aquadestilata ad | 1000 mL |

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

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

| | |
|----------------------------|-----------|
| Pepton from casein | 20 |
| Pepton from meat | 6 |
| Ammonium Iron (II) citrate | 0,2 |
| Sodium thiosulfate | 0,2 |
| Agar-agar | 0,2 |
| pH | 7,3 ± 0,1 |

Aquadestilata ad 1000 mL

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

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

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

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

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

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

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

7. Formulasi dan pembuatan Citrat

| | |
|---------------------------------|------|
| Ammonium dihydrogen phosphate | 1,0 |
| di-potassium hydrogen phosphate | 1,0 |
| Sodium chloride | 5,0 |
| Sodium citrate | 2,0 |
| Magnesium sulfat | 0,2 |
| Bromothymol blue | 0,08 |

| | | |
|---------------|----|-----------|
| Agar-agar | | 12,0 |
| pH | | 6,9 ± 0,1 |
| Aquadestilata | ad | 1000 mL |

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

Lampiran 18. Pengolahan data dengan SPSS

Descriptive Statistics

| | N | Mean | Std. Deviation | Minimum | Maximum |
|----------|----|-------|----------------|---------|---------|
| diameter | 42 | 11,55 | 6,787 | 0 | 32 |

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | diameter |
|----------------------------------|----------------|----------|
| N | | 42 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | 11,55 |
| | Std. Deviation | 6,787 |
| Most Extreme Differences | Absolute | ,192 |
| | Positive | ,192 |
| | Negative | -,135 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | 1,246 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | ,090 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

diameter

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------------|--------|-------|-------------------|---------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Ciprofloksasin | 3 | 31,00 | 1,000 | ,577 | 28,52 | 33,48 | 30 | 32 |
| DMSO 5% | 3 | ,00 | ,000 | ,000 | ,00 | ,00 | 0 | 0 |
| <i>n</i> -heksana 50% | 3 | 6,33 | ,577 | ,333 | 4,90 | 7,77 | 6 | 7 |
| <i>n</i> -heksana 25% | 3 | 8,67 | 1,528 | ,882 | 4,87 | 12,46 | 7 | 10 |
| <i>n</i> -heksana 12,5% | 3 | 7,33 | ,577 | ,333 | 5,90 | 8,77 | 7 | 8 |
| etil asetat 50% | 3 | 13,00 | 1,000 | ,577 | 10,52 | 15,48 | 12 | 14 |
| etil asetat 25% | 3 | 16,67 | 2,517 | 1,453 | 10,42 | 22,92 | 14 | 19 |
| etil asetat 12,5% | 3 | 14,00 | 1,732 | 1,000 | 9,70 | 18,30 | 12 | 15 |
| air 50% | 3 | 9,33 | ,577 | ,333 | 7,90 | 10,77 | 9 | 10 |
| air 25% | 3 | 12,33 | 1,155 | ,667 | 9,46 | 15,20 | 11 | 13 |
| air 12,5% | 3 | 11,00 | 2,646 | 1,528 | 4,43 | 17,57 | 9 | 14 |
| ekstrak 50% | 3 | 9,67 | 1,528 | ,882 | 5,87 | 13,46 | 8 | 11 |
| ekstrak 25% | 3 | 11,00 | 1,000 | ,577 | 8,52 | 13,48 | 10 | 12 |
| ekstrak 12,5% | 3 | 11,33 | 2,082 | 1,202 | 6,16 | 16,50 | 9 | 13 |
| Total | 4 2 | 11,55 | 6,787 | 1,047 | 9,43 | 13,66 | 0 | 32 |

Test of Homogeneity of Variances

diameter

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 2,354 | 13 | 28 | ,028 |

ANOVA

diameter

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 1827,071 | 13 | 140,544 | 64,161 | ,000 |
| Within Groups | 61,333 | 28 | 2,190 | | |
| Total | 1888,405 | 41 | | | |

Post hoc test

Multiple Comparisons

Dependent Variable: diameter

| | (I) perlakuan | (J) perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | | | |
|--------------|----------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------|----------------|--------|--------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Tukey HSD | Ciprofloksasin | DMSO 5% | 31,000 [*] | 1,208 | ,000 | 26,58 | 35,42 | | |
| | | <i>n</i> -heksana 50% | 24,667 [*] | 1,208 | ,000 | 20,24 | 29,09 | | |
| | | <i>n</i> -heksana 25% | 22,333 [*] | 1,208 | ,000 | 17,91 | 26,76 | | |
| | | <i>n</i> -heksana 12,5% | 23,667 [*] | 1,208 | ,000 | 19,24 | 28,09 | | |
| | | etil asetat 50% | 18,000 [*] | 1,208 | ,000 | 13,58 | 22,42 | | |
| | | etil asetat 25% | 14,333 [*] | 1,208 | ,000 | 9,91 | 18,76 | | |
| | | etil asetat 12,5% | 17,000 [*] | 1,208 | ,000 | 12,58 | 21,42 | | |
| | | air 50% | 21,667 [*] | 1,208 | ,000 | 17,24 | 26,09 | | |
| | | air 25% | 18,667 [*] | 1,208 | ,000 | 14,24 | 23,09 | | |
| | | air 12,5% | 20,000 [*] | 1,208 | ,000 | 15,58 | 24,42 | | |
| | | ekstrak 50% | 21,333 [*] | 1,208 | ,000 | 16,91 | 25,76 | | |
| | | ekstrak 25% | 20,000 [*] | 1,208 | ,000 | 15,58 | 24,42 | | |
| | | ekstrak 12,5% | 19,667 [*] | 1,208 | ,000 | 15,24 | 24,09 | | |
| | | | DMSO 5% | Ciprofloksasin | -31,000 [*] | 1,208 | ,000 | -35,42 | -26,58 |
| | | | | <i>n</i> -heksana 50% | -6,333 [*] | 1,208 | ,001 | -10,76 | -1,91 |
| | | <i>n</i> -heksana 25% | -8,667 [*] | 1,208 | ,000 | -13,09 | -4,24 | | |

| | | | | | | |
|---------------------------------|--|----------|-------|-------|--------|--------|
| n-heksana 12,5% | | -7,333* | 1,208 | ,000 | -11,76 | -2,91 |
| etil asetat 50% | | -13,000* | 1,208 | ,000 | -17,42 | -8,58 |
| etil asetat 25% | | -16,667* | 1,208 | ,000 | -21,09 | -12,24 |
| etil asetat 12,5% | | -14,000* | 1,208 | ,000 | -18,42 | -9,58 |
| air 50% | | -9,333* | 1,208 | ,000 | -13,76 | -4,91 |
| air 25% | | -12,333* | 1,208 | ,000 | -16,76 | -7,91 |
| air 12,5% | | -11,000* | 1,208 | ,000 | -15,42 | -6,58 |
| ekstrak 50% | | -9,667* | 1,208 | ,000 | -14,09 | -5,24 |
| ekstrak 25% | | -11,000* | 1,208 | ,000 | -15,42 | -6,58 |
| ekstrak 12,5% | | -11,333* | 1,208 | ,000 | -15,76 | -6,91 |
| n-heksana 50% Ciprofloksasin | | -24,667* | 1,208 | ,000 | -29,09 | -20,24 |
| DMSO 5% | | 6,333* | 1,208 | ,001 | 1,91 | 10,76 |
| n-heksana 25% | | -2,333 | 1,208 | ,794 | -6,76 | 2,09 |
| n-heksana 12,5% | | -1,000 | 1,208 | 1,000 | -5,42 | 3,42 |
| etil asetat 50% | | -6,667* | 1,208 | ,000 | -11,09 | -2,24 |
| etil asetat 25% | | -10,333* | 1,208 | ,000 | -14,76 | -5,91 |
| etil asetat 12,5% | | -7,667* | 1,208 | ,000 | -12,09 | -3,24 |
| air 50% | | -3,000 | 1,208 | ,452 | -7,42 | 1,42 |
| air 25% | | -6,000* | 1,208 | ,002 | -10,42 | -1,58 |
| air 12,5% | | -4,667* | 1,208 | ,031 | -9,09 | -,24 |
| ekstrak 50% | | -3,333 | 1,208 | ,300 | -7,76 | 1,09 |
| ekstrak 25% | | -4,667* | 1,208 | ,031 | -9,09 | -,24 |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| | ekstrak 12,5% | -5,000* | 1,208 | ,016 | -9,42 | -,58 |
| n-heksana 25% | Ciprofloksasin | -22,333* | 1,208 | ,000 | -26,76 | -17,91 |
| | DMSO 5% | 8,667* | 1,208 | ,000 | 4,24 | 13,09 |
| | n-heksana 50% | 2,333 | 1,208 | ,794 | -2,09 | 6,76 |
| | n-heksana 12,5% | 1,333 | 1,208 | ,997 | -3,09 | 5,76 |
| | etil asetat 50% | -4,333 | 1,208 | ,059 | -8,76 | ,09 |
| | etil asetat 25% | -8,000* | 1,208 | ,000 | -12,42 | -3,58 |
| | etil asetat 12,5% | -5,333* | 1,208 | ,008 | -9,76 | -,91 |
| | air 50% | -,667 | 1,208 | 1,000 | -5,09 | 3,76 |
| | air 25% | -3,667 | 1,208 | ,184 | -8,09 | ,76 |
| | air 12,5% | -2,333 | 1,208 | ,794 | -6,76 | 2,09 |
| | ekstrak 50% | -1,000 | 1,208 | 1,000 | -5,42 | 3,42 |
| | ekstrak 25% | -2,333 | 1,208 | ,794 | -6,76 | 2,09 |
| | ekstrak 12,5% | -2,667 | 1,208 | ,628 | -7,09 | 1,76 |
| n-heksana 12,5% | Ciprofloksasin | -23,667* | 1,208 | ,000 | -28,09 | -19,24 |
| | DMSO 5% | 7,333* | 1,208 | ,000 | 2,91 | 11,76 |
| | n-heksana 50% | 1,000 | 1,208 | 1,000 | -3,42 | 5,42 |
| | n-heksana 25% | -1,333 | 1,208 | ,997 | -5,76 | 3,09 |
| | etil asetat 50% | -5,667* | 1,208 | ,004 | -10,09 | -1,24 |
| | etil asetat 25% | -9,333* | 1,208 | ,000 | -13,76 | -4,91 |
| | etil asetat 12,5% | -6,667* | 1,208 | ,000 | -11,09 | -2,24 |
| | air 50% | -2,000 | 1,208 | ,915 | -6,42 | 2,42 |

| | | | | | | |
|-----------------|----------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| | air 25% | -5,000* | 1,208 | ,016 | -9,42 | -,58 |
| | air 12,5% | -3,667 | 1,208 | ,184 | -8,09 | ,76 |
| | ekstrak 50% | -2,333 | 1,208 | ,794 | -6,76 | 2,09 |
| | ekstrak 25% | -3,667 | 1,208 | ,184 | -8,09 | ,76 |
| | ekstrak 12,5% | -4,000 | 1,208 | ,107 | -8,42 | ,42 |
| etil asetat 50% | Ciprofloksasin | -18,000* | 1,208 | ,000 | -22,42 | -13,58 |
| | DMSO 5% | 13,000* | 1,208 | ,000 | 8,58 | 17,42 |
| | N-heksana 50% | 6,667* | 1,208 | ,000 | 2,24 | 11,09 |
| | n-heksana 25% | 4,333 | 1,208 | ,059 | -,09 | 8,76 |
| | n-heksana 12,5% | 5,667* | 1,208 | ,004 | 1,24 | 10,09 |
| | etil asetat 25% | -3,667 | 1,208 | ,184 | -8,09 | ,76 |
| | etil asetat 12,5% | -1,000 | 1,208 | 1,000 | -5,42 | 3,42 |
| | air 50% | 3,667 | 1,208 | ,184 | -,76 | 8,09 |
| | air 25% | ,667 | 1,208 | 1,000 | -3,76 | 5,09 |
| | air 12,5% | 2,000 | 1,208 | ,915 | -2,42 | 6,42 |
| | ekstrak 50% | 3,333 | 1,208 | ,300 | -1,09 | 7,76 |
| | ekstrak 25% | 2,000 | 1,208 | ,915 | -2,42 | 6,42 |
| | ekstrak 12,5% | 1,667 | 1,208 | ,977 | -2,76 | 6,09 |
| etil asetat 25% | Ciprofloksasin | -14,333* | 1,208 | ,000 | -18,76 | -9,91 |
| | DMSO 5% | 16,667* | 1,208 | ,000 | 12,24 | 21,09 |
| | n-heksana 50% | 10,333* | 1,208 | ,000 | 5,91 | 14,76 |
| | n-heksana 25% | 8,000* | 1,208 | ,000 | 3,58 | 12,42 |

| | | | | | | |
|----------------------|----------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| | n-heksana 12,5% | 9,333* | 1,208 | ,000 | 4,91 | 13,76 |
| | etil asetat 50% | 3,667 | 1,208 | ,184 | -,76 | 8,09 |
| | etil asetat 12,5% | 2,667 | 1,208 | ,628 | -1,76 | 7,09 |
| | air 50% | 7,333* | 1,208 | ,000 | 2,91 | 11,76 |
| | air 25% | 4,333 | 1,208 | ,059 | -,09 | 8,76 |
| | air 12,5% | 5,667* | 1,208 | ,004 | 1,24 | 10,09 |
| | ekstrak 50% | 7,000* | 1,208 | ,000 | 2,58 | 11,42 |
| | ekstrak 25% | 5,667* | 1,208 | ,004 | 1,24 | 10,09 |
| | ekstrak 12,5% | 5,333* | 1,208 | ,008 | ,91 | 9,76 |
| etil asetat 12,5% | Ciprofloksasin | -17,000* | 1,208 | ,000 | -21,42 | -12,58 |
| | DMSO 5% | 14,000* | 1,208 | ,000 | 9,58 | 18,42 |
| | n-heksana 50% | 7,667* | 1,208 | ,000 | 3,24 | 12,09 |
| | n-heksana 25% | 5,333* | 1,208 | ,008 | ,91 | 9,76 |
| | n-heksana 12,5% | 6,667* | 1,208 | ,000 | 2,24 | 11,09 |
| | etil asetat 50% | 1,000 | 1,208 | 1,000 | -3,42 | 5,42 |
| | etil asetat 25% | -2,667 | 1,208 | ,628 | -7,09 | 1,76 |
| | air 50% | 4,667* | 1,208 | ,031 | ,24 | 9,09 |
| | air 25% | 1,667 | 1,208 | ,977 | -2,76 | 6,09 |
| | air 12,5% | 3,000 | 1,208 | ,452 | -1,42 | 7,42 |
| | ekstrak 50% | 4,333 | 1,208 | ,059 | -,09 | 8,76 |
| | ekstrak 25% | 3,000 | 1,208 | ,452 | -1,42 | 7,42 |
| | ekstrak 12,5% | 2,667 | 1,208 | ,628 | -1,76 | 7,09 |

| | | | | | | |
|---------|----------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| air 50% | Ciprofloksasin | -21,667* | 1,208 | ,000 | -26,09 | -17,24 |
| | DMSO 5% | 9,333* | 1,208 | ,000 | 4,91 | 13,76 |
| | n-heksana 50% | 3,000 | 1,208 | ,452 | -1,42 | 7,42 |
| | n-heksana 25% | ,667 | 1,208 | 1,000 | -3,76 | 5,09 |
| | n-heksana 12,5% | 2,000 | 1,208 | ,915 | -2,42 | 6,42 |
| | etil asetat 50% | -3,667 | 1,208 | ,184 | -8,09 | ,76 |
| | etil asetat 25% | -7,333* | 1,208 | ,000 | -11,76 | -2,91 |
| | etil asetat 12,5% | -4,667* | 1,208 | ,031 | -9,09 | -,24 |
| | air 25% | -3,000 | 1,208 | ,452 | -7,42 | 1,42 |
| | air 12,5% | -1,667 | 1,208 | ,977 | -6,09 | 2,76 |
| | ekstrak 50% | -,333 | 1,208 | 1,000 | -4,76 | 4,09 |
| | ekstrak 25% | -1,667 | 1,208 | ,977 | -6,09 | 2,76 |
| | ekstrak 12,5% | -2,000 | 1,208 | ,915 | -6,42 | 2,42 |
| air 25% | Ciprofloksasin | -18,667* | 1,208 | ,000 | -23,09 | -14,24 |
| | DMSO 5% | 12,333* | 1,208 | ,000 | 7,91 | 16,76 |
| | n-heksana 50% | 6,000* | 1,208 | ,002 | 1,58 | 10,42 |
| | n-heksana 25% | 3,667 | 1,208 | ,184 | -,76 | 8,09 |
| | n-heksana 12,5% | 5,000* | 1,208 | ,016 | ,58 | 9,42 |
| | etil asetat 50% | -,667 | 1,208 | 1,000 | -5,09 | 3,76 |
| | etil asetat 25% | -4,333 | 1,208 | ,059 | -8,76 | ,09 |
| | etil asetat 12,5% | -1,667 | 1,208 | ,977 | -6,09 | 2,76 |
| | air 50% | 3,000 | 1,208 | ,452 | -1,42 | 7,42 |

| | | | | | | |
|-------------|----------------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| | air 12,5% | 1,333 | 1,208 | ,997 | -3,09 | 5,76 |
| | ekstrak 50% | 2,667 | 1,208 | ,628 | -1,76 | 7,09 |
| | ekstrak 25% | 1,333 | 1,208 | ,997 | -3,09 | 5,76 |
| | ekstrak 12,5% | 1,000 | 1,208 | 1,000 | -3,42 | 5,42 |
| air 12,5% | Ciprofloksasin | -20,000* | 1,208 | ,000 | -24,42 | -15,58 |
| | DMSO 5% | 11,000* | 1,208 | ,000 | 6,58 | 15,42 |
| | <i>n</i> -heksana 50% | 4,667* | 1,208 | ,031 | ,24 | 9,09 |
| | <i>n</i> -heksana 25% | 2,333 | 1,208 | ,794 | -2,09 | 6,76 |
| | <i>n</i> -heksana 12,5% | 3,667 | 1,208 | ,184 | -,76 | 8,09 |
| | etil asetat 50% | -2,000 | 1,208 | ,915 | -6,42 | 2,42 |
| | etil asetat 25% | -5,667* | 1,208 | ,004 | -10,09 | -1,24 |
| | etil asetat 12,5% | -3,000 | 1,208 | ,452 | -7,42 | 1,42 |
| | air 50% | 1,667 | 1,208 | ,977 | -2,76 | 6,09 |
| | air 25% | -1,333 | 1,208 | ,997 | -5,76 | 3,09 |
| | ekstrak 50% | 1,333 | 1,208 | ,997 | -3,09 | 5,76 |
| | ekstrak 25% | ,000 | 1,208 | 1,000 | -4,42 | 4,42 |
| | ekstrak 12,5% | -,333 | 1,208 | 1,000 | -4,76 | 4,09 |
| ekstrak 50% | Ciprofloksasin | -21,333* | 1,208 | ,000 | -25,76 | -16,91 |
| | DMSO 5% | 9,667* | 1,208 | ,000 | 5,24 | 14,09 |
| | <i>n</i> -heksana 50% | 3,333 | 1,208 | ,300 | -1,09 | 7,76 |
| | <i>n</i> -heksana 25% | 1,000 | 1,208 | 1,000 | -3,42 | 5,42 |
| | <i>n</i> -heksana 12,5% | 2,333 | 1,208 | ,794 | -2,09 | 6,76 |

| | | | | | | |
|---------------|----------------------------|---------|-------|-------|--------|--------|
| | etil asetat 50% | -3,333 | 1,208 | ,300 | -7,76 | 1,09 |
| | etil asetat 25% | -7,000 | 1,208 | ,000 | -11,42 | -2,58 |
| | etil asetat 12,5% | -4,333 | 1,208 | ,059 | -8,76 | ,09 |
| | air 50% | ,333 | 1,208 | 1,000 | -4,09 | 4,76 |
| | air 25% | -2,667 | 1,208 | ,628 | -7,09 | 1,76 |
| | air 12,5% | -1,333 | 1,208 | ,997 | -5,76 | 3,09 |
| | ekstrak 25% | -1,333 | 1,208 | ,997 | -5,76 | 3,09 |
| | ekstrak 12,5% | -1,667 | 1,208 | ,977 | -6,09 | 2,76 |
| ekstrak 25% | Ciprofloksasin | -20,000 | 1,208 | ,000 | -24,42 | -15,58 |
| | DMSO 5% | 11,000 | 1,208 | ,000 | 6,58 | 15,42 |
| | <i>n</i> -heksana 50% | 4,667 | 1,208 | ,031 | ,24 | 9,09 |
| | <i>n</i> -heksana 25% | 2,333 | 1,208 | ,794 | -2,09 | 6,76 |
| | <i>n</i> -heksana 12,5% | 3,667 | 1,208 | ,184 | -,76 | 8,09 |
| | etil asetat 50% | -2,000 | 1,208 | ,915 | -6,42 | 2,42 |
| | etil asetat 25% | -5,667 | 1,208 | ,004 | -10,09 | -1,24 |
| | etil asetat 12,5% | -3,000 | 1,208 | ,452 | -7,42 | 1,42 |
| | air 50% | 1,667 | 1,208 | ,977 | -2,76 | 6,09 |
| | air 25% | -1,333 | 1,208 | ,997 | -5,76 | 3,09 |
| | air 12,5% | ,000 | 1,208 | 1,000 | -4,42 | 4,42 |
| | ekstrak 50% | 1,333 | 1,208 | ,997 | -3,09 | 5,76 |
| | ekstrak 12,5% | -,333 | 1,208 | 1,000 | -4,76 | 4,09 |
| ekstrak 12,5% | Ciprofloksasin | -19,667 | 1,208 | ,000 | -24,09 | -15,24 |

| | | | | | | |
|---------------------------|----------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | DMSO 5% | 11,333* | 1,208 | ,000 | 6,91 | 15,76 |
| | n-heksana 50% | 5,000* | 1,208 | ,016 | ,58 | 9,42 |
| | n-heksana 25% | 2,667 | 1,208 | ,628 | -1,76 | 7,09 |
| | n-heksana 12,5% | 4,000 | 1,208 | ,107 | -,42 | 8,42 |
| | etil asetat 50% | -1,667 | 1,208 | ,977 | -6,09 | 2,76 |
| | etil asetat 25% | -5,333* | 1,208 | ,008 | -9,76 | -,91 |
| | etil asetat 12,5% | -2,667 | 1,208 | ,628 | -7,09 | 1,76 |
| | air 50% | 2,000 | 1,208 | ,915 | -2,42 | 6,42 |
| | air 25% | -1,000 | 1,208 | 1,000 | -5,42 | 3,42 |
| | air 12,5% | ,333 | 1,208 | 1,000 | -4,09 | 4,76 |
| | ekstrak 50% | 1,667 | 1,208 | ,977 | -2,76 | 6,09 |
| | ekstrak 25% | ,333 | 1,208 | 1,000 | -4,09 | 4,76 |
| Bonferroni Ciprofloksasin | DMSO 5% | 31,000* | 1,208 | ,000 | 26,29 | 35,71 |
| | n-heksana 50% | 24,667* | 1,208 | ,000 | 19,95 | 29,38 |
| | n-heksana 25% | 22,333* | 1,208 | ,000 | 17,62 | 27,05 |
| | n-heksana 12,5% | 23,667* | 1,208 | ,000 | 18,95 | 28,38 |
| | etil asetat 50% | 18,000* | 1,208 | ,000 | 13,29 | 22,71 |
| | etil asetat 25% | 14,333* | 1,208 | ,000 | 9,62 | 19,05 |
| | etil asetat 12,5% | 17,000* | 1,208 | ,000 | 12,29 | 21,71 |
| | air 50% | 21,667* | 1,208 | ,000 | 16,95 | 26,38 |
| | air 25% | 18,667* | 1,208 | ,000 | 13,95 | 23,38 |
| | air 12,5% | 20,000* | 1,208 | ,000 | 15,29 | 24,71 |

| | | | | | | |
|---------------|----------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| | ekstrak 50% | 21,333* | 1,208 | ,000 | 16,62 | 26,05 |
| | ekstrak 25% | 20,000* | 1,208 | ,000 | 15,29 | 24,71 |
| | ekstrak 12,5% | 19,667* | 1,208 | ,000 | 14,95 | 24,38 |
| DMSO 5% | Ciprofloksasin | -31,000* | 1,208 | ,000 | -35,71 | -26,29 |
| | n-heksana 50% | -6,333* | 1,208 | ,001 | -11,05 | -1,62 |
| | n-heksana 25% | -8,667* | 1,208 | ,000 | -13,38 | -3,95 |
| | n-heksana 12,5% | -7,333* | 1,208 | ,000 | -12,05 | -2,62 |
| | etil asetat 50% | -13,000* | 1,208 | ,000 | -17,71 | -8,29 |
| | etil asetat 25% | -16,667* | 1,208 | ,000 | -21,38 | -11,95 |
| | etil asetat 12,5% | -14,000* | 1,208 | ,000 | -18,71 | -9,29 |
| | air 50% | -9,333* | 1,208 | ,000 | -14,05 | -4,62 |
| | air 25% | -12,333* | 1,208 | ,000 | -17,05 | -7,62 |
| | air 12,5% | -11,000* | 1,208 | ,000 | -15,71 | -6,29 |
| | ekstrak 50% | -9,667* | 1,208 | ,000 | -14,38 | -4,95 |
| | ekstrak 25% | -11,000* | 1,208 | ,000 | -15,71 | -6,29 |
| | ekstrak 12,5% | -11,333* | 1,208 | ,000 | -16,05 | -6,62 |
| n-heksana 50% | Ciprofloksasin | -24,667* | 1,208 | ,000 | -29,38 | -19,95 |
| | DMSO 5% | 6,333* | 1,208 | ,001 | 1,62 | 11,05 |
| | n-heksana 25% | -2,333 | 1,208 | 1,000 | -7,05 | 2,38 |
| | n-heksana 12,5% | -1,000 | 1,208 | 1,000 | -5,71 | 3,71 |
| | etil asetat 50% | -6,667* | 1,208 | ,001 | -11,38 | -1,95 |
| | etil asetat 25% | -10,333* | 1,208 | ,000 | -15,05 | -5,62 |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| | etil asetat 12,5% | -7,667* | 1,208 | ,000 | -12,38 | -2,95 |
| | air 50% | -3,000 | 1,208 | 1,000 | -7,71 | 1,71 |
| | air 25% | -6,000* | 1,208 | ,003 | -10,71 | -1,29 |
| | air 12,5% | -4,667 | 1,208 | ,055 | -9,38 | ,05 |
| | ekstrak 50% | -3,333 | 1,208 | ,921 | -8,05 | 1,38 |
| | ekstrak 25% | -4,667 | 1,208 | ,055 | -9,38 | ,05 |
| | ekstrak 12,5% | -5,000* | 1,208 | ,026 | -9,71 | -,29 |
| n-heksana 25% | Ciprofloksasin | -22,333* | 1,208 | ,000 | -27,05 | -17,62 |
| | Dmso | 8,667* | 1,208 | ,000 | 3,95 | 13,38 |
| | n-heksana 50% | 2,333 | 1,208 | 1,000 | -2,38 | 7,05 |
| | n-heksana 12,5% | 1,333 | 1,208 | 1,000 | -3,38 | 6,05 |
| | etil asetat 50% | -4,333 | 1,208 | ,115 | -9,05 | ,38 |
| | etil asetat 25% | -8,000* | 1,208 | ,000 | -12,71 | -3,29 |
| | etil asetat 12,5% | -5,333* | 1,208 | ,013 | -10,05 | -,62 |
| | air 50% | -,667 | 1,208 | 1,000 | -5,38 | 4,05 |
| | air 25% | -3,667 | 1,208 | ,470 | -8,38 | 1,05 |
| | air 12,5% | -2,333 | 1,208 | 1,000 | -7,05 | 2,38 |
| | ekstrak 50% | -1,000 | 1,208 | 1,000 | -5,71 | 3,71 |
| | ekstrak 25% | -2,333 | 1,208 | 1,000 | -7,05 | 2,38 |
| | ekstrak 12,5% | -2,667 | 1,208 | 1,000 | -7,38 | 2,05 |
| n-heksana 12,5% | Ciprofloksasin | -23,667* | 1,208 | ,000 | -28,38 | -18,95 |
| | Dmso | 7,333* | 1,208 | ,000 | 2,62 | 12,05 |

| | | | | | | |
|-----------------|----------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| | N-heksana 50% | 1,000 | 1,208 | 1,000 | -3,71 | 5,71 |
| | n-heksana 25% | -1,333 | 1,208 | 1,000 | -6,05 | 3,38 |
| | etil asetat 50% | -5,667* | 1,208 | ,006 | -10,38 | -,95 |
| | etil asetat 25% | -9,333* | 1,208 | ,000 | -14,05 | -4,62 |
| | etil asetat 12,5% | -6,667* | 1,208 | ,001 | -11,38 | -1,95 |
| | air 50% | -2,000 | 1,208 | 1,000 | -6,71 | 2,71 |
| | air 25% | -5,000* | 1,208 | ,026 | -9,71 | -,29 |
| | air 12,5% | -3,667 | 1,208 | ,470 | -8,38 | 1,05 |
| | ekstrak 50% | -2,333 | 1,208 | 1,000 | -7,05 | 2,38 |
| | ekstrak 25% | -3,667 | 1,208 | ,470 | -8,38 | 1,05 |
| | ekstrak 12,5% | -4,000 | 1,208 | ,234 | -8,71 | ,71 |
| etil asetat 50% | Ciprofloksasin | -18,000* | 1,208 | ,000 | -22,71 | -13,29 |
| | Dmso | 13,000* | 1,208 | ,000 | 8,29 | 17,71 |
| | N-heksana 50% | 6,667* | 1,208 | ,001 | 1,95 | 11,38 |
| | n-heksana 25% | 4,333 | 1,208 | ,115 | -,38 | 9,05 |
| | n-heksana 12,5% | 5,667* | 1,208 | ,006 | ,95 | 10,38 |
| | etil asetat 25% | -3,667 | 1,208 | ,470 | -8,38 | 1,05 |
| | etil asetat 12,5% | -1,000 | 1,208 | 1,000 | -5,71 | 3,71 |
| | air 50% | 3,667 | 1,208 | ,470 | -1,05 | 8,38 |
| | air 25% | ,667 | 1,208 | 1,000 | -4,05 | 5,38 |
| | air 12,5% | 2,000 | 1,208 | 1,000 | -2,71 | 6,71 |
| | ekstrak 50% | 3,333 | 1,208 | ,921 | -1,38 | 8,05 |

| | | | | | | |
|-------------------|-------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| | ekstrak 25% | 2,000 | 1,208 | 1,000 | -2,71 | 6,71 |
| | ekstrak 12,5% | 1,667 | 1,208 | 1,000 | -3,05 | 6,38 |
| etil asetat 25% | Ciprofloksasin | -14,333* | 1,208 | ,000 | -19,05 | -9,62 |
| | Dmso | 16,667* | 1,208 | ,000 | 11,95 | 21,38 |
| | N-heksana 50% | 10,333* | 1,208 | ,000 | 5,62 | 15,05 |
| | n-heksana 25% | 8,000* | 1,208 | ,000 | 3,29 | 12,71 |
| | n-heksana 12,5% | 9,333* | 1,208 | ,000 | 4,62 | 14,05 |
| | etil asetat 50% | 3,667 | 1,208 | ,470 | -1,05 | 8,38 |
| | etil asetat 12,5% | 2,667 | 1,208 | 1,000 | -2,05 | 7,38 |
| | air 50% | 7,333* | 1,208 | ,000 | 2,62 | 12,05 |
| | air 25% | 4,333 | 1,208 | ,115 | -,38 | 9,05 |
| | air 12,5% | 5,667* | 1,208 | ,006 | ,95 | 10,38 |
| | ekstrak 50% | 7,000* | 1,208 | ,000 | 2,29 | 11,71 |
| | ekstrak 25% | 5,667* | 1,208 | ,006 | ,95 | 10,38 |
| | ekstrak 12,5% | 5,333* | 1,208 | ,013 | ,62 | 10,05 |
| etil asetat 12,5% | Ciprofloksasin | -17,000* | 1,208 | ,000 | -21,71 | -12,29 |
| | Dmso | 14,000* | 1,208 | ,000 | 9,29 | 18,71 |
| | N-heksana 50% | 7,667* | 1,208 | ,000 | 2,95 | 12,38 |
| | n-heksana 25% | 5,333* | 1,208 | ,013 | ,62 | 10,05 |
| | n-heksana 12,5% | 6,667* | 1,208 | ,001 | 1,95 | 11,38 |
| | etil asetat 50% | 1,000 | 1,208 | 1,000 | -3,71 | 5,71 |
| | etil asetat 25% | -2,667 | 1,208 | 1,000 | -7,38 | 2,05 |

| | | | | | | |
|---------|----------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| | air 50% | 4,667 | 1,208 | ,055 | -,05 | 9,38 |
| | air 25% | 1,667 | 1,208 | 1,000 | -3,05 | 6,38 |
| | air 12,5% | 3,000 | 1,208 | 1,000 | -1,71 | 7,71 |
| | ekstrak 50% | 4,333 | 1,208 | ,115 | -,38 | 9,05 |
| | ekstrak 25% | 3,000 | 1,208 | 1,000 | -1,71 | 7,71 |
| | ekstrak 12,5% | 2,667 | 1,208 | 1,000 | -2,05 | 7,38 |
| air 50% | Ciprofloksasin | -21,667* | 1,208 | ,000 | -26,38 | -16,95 |
| | Dmso | 9,333* | 1,208 | ,000 | 4,62 | 14,05 |
| | N-heksana 50% | 3,000 | 1,208 | 1,000 | -1,71 | 7,71 |
| | n-heksana 25% | ,667 | 1,208 | 1,000 | -4,05 | 5,38 |
| | n-heksana 12,5% | 2,000 | 1,208 | 1,000 | -2,71 | 6,71 |
| | etil asetat 50% | -3,667 | 1,208 | ,470 | -8,38 | 1,05 |
| | etil asetat 25% | -7,333* | 1,208 | ,000 | -12,05 | -2,62 |
| | etil asetat 12,5% | -4,667 | 1,208 | ,055 | -9,38 | ,05 |
| | air 25% | -3,000 | 1,208 | 1,000 | -7,71 | 1,71 |
| | air 12,5% | -1,667 | 1,208 | 1,000 | -6,38 | 3,05 |
| | ekstrak 50% | -,333 | 1,208 | 1,000 | -5,05 | 4,38 |
| | ekstrak 25% | -1,667 | 1,208 | 1,000 | -6,38 | 3,05 |
| | ekstrak 12,5% | -2,000 | 1,208 | 1,000 | -6,71 | 2,71 |
| air 25% | Ciprofloksasin | -18,667* | 1,208 | ,000 | -23,38 | -13,95 |
| | Dmso | 12,333* | 1,208 | ,000 | 7,62 | 17,05 |
| | N-heksana 50% | 6,000* | 1,208 | ,003 | 1,29 | 10,71 |
| | n-heksana 25% | 3,667 | 1,208 | ,470 | -1,05 | 8,38 |

| | | | | | | |
|-----------|----------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| | n-heksana 12,5% | 5,000* | 1,208 | ,026 | ,29 | 9,71 |
| | etil asetat 50% | -,667 | 1,208 | 1,000 | -5,38 | 4,05 |
| | etil asetat 25% | -4,333 | 1,208 | ,115 | -9,05 | ,38 |
| | etil asetat 12,5% | -1,667 | 1,208 | 1,000 | -6,38 | 3,05 |
| | air 50% | 3,000 | 1,208 | 1,000 | -1,71 | 7,71 |
| | air 12,5% | 1,333 | 1,208 | 1,000 | -3,38 | 6,05 |
| | ekstrak 50% | 2,667 | 1,208 | 1,000 | -2,05 | 7,38 |
| | ekstrak 25% | 1,333 | 1,208 | 1,000 | -3,38 | 6,05 |
| | ekstrak 12,5% | 1,000 | 1,208 | 1,000 | -3,71 | 5,71 |
| air 12,5% | Ciprofloksasin | -20,000* | 1,208 | ,000 | -24,71 | -15,29 |
| | Dmso | 11,000* | 1,208 | ,000 | 6,29 | 15,71 |
| | N-heksana 50% | 4,667 | 1,208 | ,055 | -,05 | 9,38 |
| | n-heksana 25% | 2,333 | 1,208 | 1,000 | -2,38 | 7,05 |
| | n-heksana 12,5% | 3,667 | 1,208 | ,470 | -1,05 | 8,38 |
| | etil asetat 50% | -2,000 | 1,208 | 1,000 | -6,71 | 2,71 |
| | etil asetat 25% | -5,667* | 1,208 | ,006 | -10,38 | -,95 |
| | etil asetat 12,5% | -3,000 | 1,208 | 1,000 | -7,71 | 1,71 |
| | air 50% | 1,667 | 1,208 | 1,000 | -3,05 | 6,38 |
| | air 25% | -1,333 | 1,208 | 1,000 | -6,05 | 3,38 |
| | ekstrak 50% | 1,333 | 1,208 | 1,000 | -3,38 | 6,05 |
| | ekstrak 25% | ,000 | 1,208 | 1,000 | -4,71 | 4,71 |
| | ekstrak 12,5% | -,333 | 1,208 | 1,000 | -5,05 | 4,38 |

| | | | | | | |
|-------------|----------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| ekstrak 50% | Ciprofloksasin | -21,333* | 1,208 | ,000 | -26,05 | -16,62 |
| | Dmso | 9,667* | 1,208 | ,000 | 4,95 | 14,38 |
| | N-heksana 50% | 3,333 | 1,208 | ,921 | -1,38 | 8,05 |
| | n-heksana 25% | 1,000 | 1,208 | 1,000 | -3,71 | 5,71 |
| | n-heksana 12,5% | 2,333 | 1,208 | 1,000 | -2,38 | 7,05 |
| | etil asetat 50% | -3,333 | 1,208 | ,921 | -8,05 | 1,38 |
| | etil asetat 25% | -7,000* | 1,208 | ,000 | -11,71 | -2,29 |
| | etil asetat 12,5% | -4,333 | 1,208 | ,115 | -9,05 | ,38 |
| | air 50% | ,333 | 1,208 | 1,000 | -4,38 | 5,05 |
| | air 25% | -2,667 | 1,208 | 1,000 | -7,38 | 2,05 |
| | air 12,5% | -1,333 | 1,208 | 1,000 | -6,05 | 3,38 |
| | ekstrak 25% | -1,333 | 1,208 | 1,000 | -6,05 | 3,38 |
| | ekstrak 12,5% | -1,667 | 1,208 | 1,000 | -6,38 | 3,05 |
| ekstrak 25% | Ciprofloksasin | -20,000* | 1,208 | ,000 | -24,71 | -15,29 |
| | Dmso | 11,000* | 1,208 | ,000 | 6,29 | 15,71 |
| | N-heksana 50% | 4,667 | 1,208 | ,055 | -,05 | 9,38 |
| | n-heksana 25% | 2,333 | 1,208 | 1,000 | -2,38 | 7,05 |
| | n-heksana 12,5% | 3,667 | 1,208 | ,470 | -1,05 | 8,38 |
| | etil asetat 50% | -2,000 | 1,208 | 1,000 | -6,71 | 2,71 |
| | etil asetat 25% | -5,667* | 1,208 | ,006 | -10,38 | -,95 |
| | etil asetat 12,5% | -3,000 | 1,208 | 1,000 | -7,71 | 1,71 |
| | air 50% | 1,667 | 1,208 | 1,000 | -3,05 | 6,38 |

| | | | | | | |
|---------------|-------------------|----------|-------|-------|--------|--------|
| | air 25% | -1,333 | 1,208 | 1,000 | -6,05 | 3,38 |
| | air 12,5% | ,000 | 1,208 | 1,000 | -4,71 | 4,71 |
| | ekstrak 50% | 1,333 | 1,208 | 1,000 | -3,38 | 6,05 |
| | ekstrak 12,5% | -,333 | 1,208 | 1,000 | -5,05 | 4,38 |
| ekstrak 12,5% | Ciprofloksasin | -19,667* | 1,208 | ,000 | -24,38 | -14,95 |
| | Dmso | 11,333* | 1,208 | ,000 | 6,62 | 16,05 |
| | N-heksana 50% | 5,000* | 1,208 | ,026 | ,29 | 9,71 |
| | n-heksana 25% | 2,667 | 1,208 | 1,000 | -2,05 | 7,38 |
| | n-heksana 12,5% | 4,000 | 1,208 | ,234 | -,71 | 8,71 |
| | etil asetat 50% | -1,667 | 1,208 | 1,000 | -6,38 | 3,05 |
| | etil asetat 25% | -5,333* | 1,208 | ,013 | -10,05 | -,62 |
| | etil asetat 12,5% | -2,667 | 1,208 | 1,000 | -7,38 | 2,05 |
| | air 50% | 2,000 | 1,208 | 1,000 | -2,71 | 6,71 |
| | air 25% | -1,000 | 1,208 | 1,000 | -5,71 | 3,71 |
| | air 12,5% | ,333 | 1,208 | 1,000 | -4,38 | 5,05 |
| | ekstrak 50% | 1,667 | 1,208 | 1,000 | -3,05 | 6,38 |
| | ekstrak 25% | ,333 | 1,208 | 1,000 | -4,38 | 5,05 |

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

Homogeneous subsets

diameter

| perlakuan | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | | |
|-----------------------------|---|-------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Tukey HSD ^a Dmso | 3 | ,00 | | | | | | |
| N-heksana 50% | 3 | | 6,33 | | | | | |
| n-heksana 12,5% | 3 | | 7,33 | 7,33 | | | | |
| n-heksana 25% | 3 | | 8,67 | 8,67 | 8,67 | | | |
| air 50% | 3 | | 9,33 | 9,33 | 9,33 | | | |
| ekstrak 50% | 3 | | 9,67 | 9,67 | 9,67 | 9,67 | | |
| air 12,5% | 3 | | | 11,00 | 11,00 | 11,00 | | |
| ekstrak 25% | 3 | | | 11,00 | 11,00 | 11,00 | | |
| ekstrak 12,5% | 3 | | | 11,33 | 11,33 | 11,33 | | |
| air 25% | 3 | | | | 12,33 | 12,33 | 12,33 | |
| etil asetat 50% | 3 | | | | 13,00 | 13,00 | 13,00 | |
| etil asetat 12,5% | 3 | | | | | 14,00 | 14,00 | |
| etil asetat 25% | 3 | | | | | | 16,67 | |
| Ciprofloksasin | 3 | | | | | | | 31,00 |
| Sig. | | 1,000 | ,300 | ,107 | ,059 | ,059 | ,059 | 1,000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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