

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSAN,  
ETIL ASETAT DAN AIR DARI DAUN BELIMBING WULUH  
(*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP BAKTERI  
*Shigella dysenteriae***



**Oleh:**

**Gracesya Indah Dayani  
20144233A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSAN,  
ETIL ASETAT DAN AIR DARI DAUN BELIMBING WULUH  
(*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP BAKTERI  
*Shigella dysenteriae***

**SKRIPSI**

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

**Oleh:**

**Gracesya Indah Dayani  
20144233A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**PENGESAHAN SKRIPSI**

berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSAN,  
ETIL ASETAT DAN AIR DARI DAUN BELIMBING WULUH  
(*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP BAKTERI  
*Shigella dysenteriae***

Oleh :

Gracesya Indah Dayani  
20144233A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada tanggal : 29 Juni 2018

Mengetahui,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi

Dekan,



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

Pembimbing Utama,

Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt

Pembimbing Pendamping,

Destik Wulandari, S.Pd., M.Si

Penguji:

1. Dr. Ana Indrayati, M.Si
2. Endang Sri Rejeki, M.Si., Apt
3. Desi Purwaningsih, S.Pd., M.Si
4. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt

1.

2.

3.

4.

## **PERNYATAAN**

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, 29 Juni 2018



Gracesya Indah Dayani

## HALAMAN PERSEMBAHAN

**“Janganlah hendaknya kamu kuatir tentang apapun juga, tetapi nyatakanlah dalam segala hal keinginanmu kepada Allah dalam doa dan permohonan dengan ucapan syukur.” Amsal 23:18**

**“Serahkanlah hidupmu kepada TUHAN dan percayalah kepada-Nya, dan Ia akan bertindak.” Mazmur 37:5**

**”Kuatkan dan teguhkan hatimu, janganlan takut dan jangan gemetar karena mereka, sebab TUHAN, Allahmu, Dialah yang berjalan menyertai engkau; Ia tidak akan membiarkan engkau dan tidak akan meninggalkan engkau.” Ulangan 31:6**

Kupersembahkan Skripsi ini untuk :

*Tuhan Yesus Kristus Juruselamat*

*Papah, Mamah, kak Pangka, kak Kristania dan keponakanku Callista tercinta yang telah memberikan cinta, kasih sayang, dukungan, semangat, nasehat dan selalu mendoakanku.*

*Sahabatku tercinta dan teman - teman seperjuangan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.*

*Almamater, Bangsa dan Negara.*

## KATA PENGANTAR

Puji Tuhan, segala puji dan syukur kepada Tuhan yang telah memberi berkat dan kebijaksanaan, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR DARI DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP BAKTERI *Shigella dysenteriae*”**. 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. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt. selaku Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, saran, masukan, pengarahan, semangat, dorongan dan bersedia meluangkan waktu untuk membantu menyelesaikan skripsi ini.
4. Destik Wulandari, S.Pd., M.Si. selaku Pembimbing Pendamping yang telah memberikan pengarahan, motivasi, bimbingan, dukungan, semangat dan bersedia meluangkan waktu untuk membantu menyelesaikan skripsi ini.
5. Yane Dila Keswara, M.Sc., Apt. selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan nasehat, bimbingan, pengarahan dan semangat selama penyelesaian masa studi.
6. Dosen penguji yang telah memberikan masukan demi kesempurnaan dalam skripsi ini.
7. Seluruh dosen, Asisten Dosen dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi.
8. Segenap pengelola perpustakaan Universitas Setia Budi Surakarta yang telah membantu dan memberikan kesempatan meminjamkan buku kepada penulis untuk menyusun skripsi ini.

9. Papah, Mamah, Kak Pangka dan Kak Kristania telah memberikan dukungan dan selalu mendoakanku yang tidak pernah putus-putusnya untuk penulis menyelesaikan skripsi ini.
10. Sahabatku di Palangka Raya yaitu Yohana Anggrenie dan Ratuti Y. Bianca yang telah memberikan doa, dorongan dan semangat untuk penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
11. Sahabat dan teman seperjuangan serta seperantauan untuk Hariyati, Octaviana, Irene, Utami, Anggun, Ovi, Irvan dan Hali terima kasih atas segala doa, dukungan, motivasi dan semangat yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
12. 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. Akhirnya, penulis berharap semoga karya tulis ini dapat bermanfaat bagi masyarakat dan perkembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang farmasi.

Surakarta, 29 Juni 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

### Halaman

|  |     |
|--|-----|
| HALAMAN JUDUL .....  | i   |
| PENGESAHAN SKRIPSI .....                                       | ii  |
| PERNYATAAN .....   | iii |
| HALAMAN PERSEMBAHAN .....                                      | iv  |
| DAFTAR ISI .....   | vii |
| DAFTAR GAMBAR .....  | x   |
| DAFTAR TABEL .....   | xi  |
| DAFTAR LAMPIRAN .....  | xii |
| INTISARI .....   | xiv |
| ABSTRACT .....   | xv  |
| BAB I PENDAHULUAN .....  | 1   |
| A. Latar Belakang .....  | 1   |
| B. Perumusan Masalah .....                                     | 3   |
| C. Tujuan Penelitian .....                                     | 3   |
| D. Kegunaan Penelitian .....                                   | 3   |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....                                  | 4   |
| A. Tanaman Belimbing Wuluh ( <i>Averrhoa bilimbi</i> L.) ..... | 4   |
| 1. Sistematika tanaman .....                                   | 4   |
| 2. Nama daerah belimbing wuluh .....                           | 4   |
| 3. Morfologi tanaman .....                                     | 4   |
| 4. Khasiat dan kegunaan .....                                  | 5   |
| 5. Kandungan kimia belimbing wuluh .....                       | 5   |
| 5.1 Flavonoid .....  | 6   |
| 5.2 Saponin .....  | 6   |
| 5.3 Tanin .....  | 6   |
| B. Simplisia .....   | 7   |
| 1. Pengertian Simplisia .....                                  | 7   |
| 2. Pencucian dan pengeringan simplisia .....                   | 7   |
| C. Metode Penyarian .....                                      | 7   |
| 1. Pengertian ekstrak .....                                    | 7   |
| 2. Metode maserasi .....                                       | 8   |
| 3. Fraksinasi .....  | 8   |



|                                 |  |    |
|---------------------------------|--|----|
| 4.                              | Pelarut.....   | 9  |
| 4.1                             | Etanol.....  | 9  |
| 4.2                             | <i>n</i> -heksan.....  | 9  |
| 4.3                             | Etil asetat.....   | 10 |
| 4.4                             | Air.....   | 10 |
| D.                              | <i>Shigella dysenteriae</i> .....                            | 10 |
| 1.                              | Sistematika bakteri.....                                     | 10 |
| 2.                              | Morfologi dan identifikasi <i>Shigella dysenteriae</i> ..... | 10 |
| 3.                              | Patogenesis dan patologi .....                               | 11 |
| 4.                              | Gambaran klinik.....   | 11 |
| 5.                              | Pengobatan disentri.....                                     | 12 |
| E.                              | Media.....   | 13 |
| F.                              | Sterilisasi.....   | 13 |
| G.                              | Kotrimoksazol.....   | 14 |
| H.                              | Aktivitas Antibakteri .....                                  | 14 |
| 1.                              | Definisi .....   | 14 |
| 2.                              | Mekanisme kerja antibakteri.....                             | 15 |
| 2.1                             | Menghambat sintesis dinding sel bakteri.....                 | 15 |
| 2.2                             | Menghambat metabolisme sel bakteri.....                      | 15 |
| 2.3                             | Menggangu keutuhan membran sel bakteri.....                  | 15 |
| 2.4                             | Menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri.....            | 16 |
| 2.5                             | Menghambat sintesis protein sel bakteri.....                 | 16 |
| I.                              | Uji Aktivitas Antibakteri .....                              | 16 |
| 1.                              | Metode difusi .....  | 16 |
| 2.                              | Metode dilusi.....   | 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.                              | Rencana Jalannya Penelitian .....                            | 23 |
| 1.                              | Determinasi tanaman .....                                    | 23 |
| 2.                              | Pembuatan serbuk daun belimbing wuluh .....                  | 23 |
| 3.                              | Penetapan kadar lembab .....                                 | 23 |
| 4.                              | Pembuatan ekstrak etanol daun belimbing wuluh .....          | 23 |
| 5.                              | Uji bebas etanol.....  | 24 |

|  |  |    |
|--|--|----|
| 6.   | Fraksinasi.....  | 24 |
| 7.   | Identifikasi kandungan senyawa kimia.....  | 24 |
| 7.1  | Uji flavonoid. ....  | 25 |
| 7.2  | Uji tanin. ....  | 25 |
| 7.3  | Uji saponin. ....  | 25 |
| 7.4  | Uji alkaloid.....  | 25 |
| 8.   | Sterilisasi .....  | 25 |
| 9.   | Pembuatan suspensi bakteri .....   | 26 |
| 10.  | Identifikasi bakteri uji <i>Shigella dysenteriae</i> .....                         | 26 |
| 10.1   | Identifikasi bakteri secara goresan. ....  | 26 |
| 10.2   | Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram. ....                                   | 26 |
| 10.3   | Identifikasi secara biokimia. ....   | 26 |
| 11.  | Pengujian aktivitas antibakteri daun belimbing wuluh.....                          | 27 |
| 11.1   | Pengujian antibakteri secara difusi. ....  | 27 |
| 11.2   | Pengujian antibakteri secara dilusi. ....  | 28 |
| E.   | Analisis Hasil .....   | 29 |
| BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN ..... |  | 34 |
| A.   | Hasil Penelitian .....   | 34 |
| 1.   | Hasil identifikasi tanaman daun belimbing wuluh ( <i>Averrhoa bilimbi</i> L.)..... | 34 |
| 1.1  | Determinasi tanaman .....  | 34 |
| 1.2  | Deskripsi Tanaman.....   | 34 |
| 2.   | Hasil pembuatan serbuk daun belimbing wuluh.....                                   | 35 |
| 3.   | Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh...35                      |    |
| 4.   | Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun belimbing wuluh .....                        | 36 |
| 5.   | Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi daun daun belimbing wuluh .....            | 36 |
| 6.   | Hasil fraksinasi ekstrak daun belimbing wuluh.....                                 | 37 |
| 7.   | Hasil identifikasi kandungan kimia daun belimbing wuluh.....                       | 38 |
| 8.   | Hasil identifikasi bakteri uji <i>Shigella dysenteriae</i> .....                   | 39 |
| 8.1.   | Hasil identifikasi bakteri secara pewarnaan Gram. ....                             | 39 |
| 8.2.   | Hasil identifikasi bakteri secara goresan. ....                                    | 40 |
| 8.3.   | Hasil identifikasi bakteri uji secara biokimia .....                               | 40 |
| 9.   | Hasil pengujian antibakteri secara difusi.....                                     | 42 |
| 10.  | Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi.....                           | 46 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....              |  | 49 |
| A.   | Kesimpulan .....   | 49 |
| B.   | Saran .....  | 49 |
| DAFTAR PUSTAKA .....                         |  | 50 |
| LAMPIRAN .....                               |  | 55 |

## DAFTAR GAMBAR

|  | <b>Halaman</b> |
|--|----------------|
| Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun belimbing wuluh.....  | 30             |
| Gambar 2. Skema uji aktivitas antibakteri.....   | 31             |
| Gambar 3. Skema pengujian aktivitas daun belimbing wuluh terhadap <i>Shigella dysenteriae</i> .....                                    | 32             |
| Gambar 4. Skema pengujian aktivitas daun belimbing wuluh terhadap <i>Shigella dysenteriae</i> secara dilusi .....                      | 33             |
| Gambar 5. Hasil identifikasi mikroskopis terhadap bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> dengan pewarnaan Gram.....                       | 40             |
| Gambar 6. Hasil identifikasi bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> secara goresan pada media <i>Salmonella Shigella Agar (SSA)</i> ..... | 40             |
| Gambar 7. Hasil identifikasi bakteri uji <i>Shigella dysenteriae</i> secara biokimia menggunakan media SIM, KIA, LIA dan CITRAT .....  | 41             |

## DAFTAR TABEL

|   | <b>Halaman</b> |
|---|----------------|
| Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh .....  | 35             |
| Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab daun belimbing wuluh .....  | 35             |
| Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun belimbing wuluh .....  | 36             |
| Tabel 4. Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi belimbing wuluh .....  | 36             |
| Tabel 5. Rendemen hasil fraksi n-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak daun belimbing wuluh.....   | 37             |
| Tabel 6. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun belimbing wuluh .....   | 38             |
| Tabel 7. Identifikasi kandungan kimia fraksinasi dari ekstrak daun belimbing wuluh.....   | 39             |
| Tabel 8. Hasil identifikasi biokimia pada <i>Shigella dysenteriae</i> .....   | 41             |
| Tabel 9. Diameter hambat pada uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat, air, dan ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> ..... | 43             |
| Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari ekstrak daun belimbing wuluh terhadap bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> secara dilusi.....                        | 46             |

## DAFTAR LAMPIRAN

|  | <b>Halaman</b> |
|--|----------------|
| Lampiran 1. Hasil Determinasi .....  | 56             |
| Lampiran 2. Gambar daun dan serbuk belimbing wuluh.....  | 57             |
| Lampiran 3. Gambar alat penelitian .....   | 58             |
| Lampiran 4. Hasil fraksinasi dari ekstrak daun belimbing wuluh.....  | 60             |
| Lampiran 5. Hasil uji bebas etanol ekstrak kental daun belimbing wuluh .....   | 60             |
| Lampiran 6. Hasil Identifikasi kimia serbuk dan ekstrak daun belimbing wuluh.....  | 61             |
| Lampiran 7. Hasil Identifikasi kimia fraksinasi dari ekstrak daun belimbing wuluh .....  | 63             |
| Lampiran 8. Gambar identifikasi secara goresan bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> di media SSA .....  | 65             |
| Lampiran 9. Gambar uji mikroskopis bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> dengan pewarnaan Gram.....  | 65             |
| Lampiran 10. Hasil identifikasi bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> dengan media SIM, KIA, LIA dan CITRAT .....                                | 66             |
| Lampiran 11. Hasil uji aktivitas fraksi dan ekstrak dari daun belimbing wuluh terhadap bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> secara difusi ..... | 67             |
| Lampiran 12. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun belimbing terhadap <i>Shigella dysenteriae</i> secara dilusi.....         | 68             |
| Lampiran 13. Hasil prosentase bobot kering terhadap bobot basah.....   | 70             |
| Lampiran 14. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh secara <i>moisture balance</i> .....                                | 70             |
| Lampiran 15. Hasil perhitungan persen rendemen maserasi ekstrak daun belimbing wuluh .....   | 70             |
| Lampiran 16. Hasil rendemen fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat dan air ekstrak daun belimbing wuluh.....                                     | 71             |
| Lampiran 17. Perhitungan diameter hambat pada uji aktivitas antibakteri daun belimbing wuluh terhadap <i>Shigella dysenteriae</i> .....        | 72             |

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| Lampiran 18. | Perhitungan pengenceran DMSO (Dimethyl Sulfoxida) ..... | 72 |
| Lampiran 19. | Pembuatan larutan stok konsentrasi uji difusi .....     | 73 |
| Lampiran 20. | Pembuatan larutan stok konsentrasi uji dilusi .....     | 74 |
| Lampiran 21. | Pembuatan Media .....                                   | 76 |
| Lampiran 22. | Pembuatan suspensi Mc Farland 0,5.....                  | 79 |
| Lampiran 23. | Analisis Data .....                                     | 79 |

## INTISARI

**DAYANI, G.I., 2018, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR DARI DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP BAKTERI *Shigella dysenteriae*, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.**

Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) adalah tanaman yang digunakan secara empiris sebagai obat disentri. Kandungan kimia daun belimbing wuluh adalah flavonoid, saponin dan tanin. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), ketiga fraksi teraktif, dan Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum dari fraksi teraktif terhadap *Shigella dysenteriae*.

Ekstraksi daun belimbing wuluh menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, kemudian difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Hasil ekstraksi dan fraksinasi dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* menggunakan metode difusi dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% dan metode dilusi dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% dan 0,09%.

Hasil uji metode difusi menunjukkan fraksi etil asetat memiliki daya hambat paling aktif terhadap *Shigella dysenteriae* yaitu 12,43 mm pada konsentrasi 50%. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat terhadap *Shigella dysenteriae* adalah konsentrasi 12,5% dengan menggunakan metode dilusi cair.

---

---

Kata kunci: daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), *Shigella dysenteriae*, uji aktivitas antibakteri, fraksi

## ABSTRACT

**DAYANI, G.I., 2018, ANTIBACTERIAL ACTIVITY TESTS OF ETHANOL EXTRACT, *n*-HEXANE FRACTION, ETHYL ACETATE AND WATER FROM BELIMBING WULUH LEAVES (*Averrhoa bilimbi* L.) TOWARD *Shigella dysenteriae* BACTERIA, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.**

Belimbing wuluh leaves (*Averrhoa bilimbi* L.) is a plant which is used empirically as a medicine for dysentery. The chemical contents of belimbing wuluh leaves are flavonoids, saponins and tannin. This research was conducted to know the antibacterial activities of ethanol extract, *n*-hexane fraction, ethyl acetate and water from belimbing wuluh leaves (*Averrhoa bilimbi* L.), the three most active fractions, and Minimum Inhibition Concentration and Minimum Kill Concentration from active fraction toward *Shigella dysenteriae*.

The extraction of belimbing wuluh leaves used maceration method with 70% of ethanol solvent, and then it was fractionated by using *n*-hexane solvent, ethyl acetate and water. The results of extraction and fractionation were tested of antibacterial activity toward *Shigella dysenteriae* using diffusion method with 50%, 25%, 12,5% concentrations and dilution method with 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12 %, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% and 0,09% concentrations.

The test result of diffusion method showed that ethyl acetate fraction has the most active inhibitory effect on *Shigella dysenteriae* which is 12,43 mm at concentration 50%. Minimum Kill Concentration (MKC) ethyl acetate fraction toward *Shigella dysenteriae* is concentration 12,5% by using dilution liquid method.

---

---

Key words: belimbing wuluh leaves (*Averrhoa bilimbi* L.), *Shigella dysenteriae*, antibacterial activity test, fraction



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Penyakit infeksi merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk di negara berkembang termasuk Indonesia. salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri (Radji 2011). Sekitar 30% kejadian infeksi di Amerika Serikat berasal dari rumah sakit (*nosocomial infection*). Di Indonesia bakteri Gram negatif yang sering terjadi penyebab infeksi terkait rumah sakit cenderung resisten terhadap antibiotik yang digunakan (Bela 2011). Disentri merupakan gangguan pencernaan yang menular, yang ditandai dengan peradangan usus, terutama usus besar. Penyakit ini ditandai dengan diare cair akut dan atau disentri (tinja bercampur darah, lendir, dan nanah), pada umumnya disertai demam, nyeri perut, dan tenesmus. Disentri terutama dapat menyebar diantara orang-orang melalui makanan dan air yang terkontaminasi serta sanitas yang buruk. Ada beberapa bakteri yang menyebabkan disentri akut, termasuk *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Campylobacter sp*, dan *Escherechia coli* (Khalili 2014).

*Shigella dysenteriae* merupakan bakteri Gram negatif. *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri patogen karena menghasilkan endotoksin dan eksotoksin, dimana keduanya bekerja secara berurutan. Eksotoksin menyebabkan diare akut dan tidak disertai darah pada tinja kemudian invasi pada usus besar yang disebabkan endotoksin sehingga terjadilah disentri, yaitu diare akut yang disertai darah dengan atau tanpa lendir dalam feses (Jawetz *et al.* 2010).

Pengobatan disentri dilakukan dengan pengobatan simptomatik dan pengobatan kausatif. Pengobatan kausatif kuman penyebabnya dimatikan dengan zat antibakteri. Antibiotik terpilih untuk infeksi *Shigella* adalah ciprofloksasin, ampicilin, tetrasiklin, dan kotrimoksazol, namun kasus resistensi dari *Shigella* terhadap antibiotik tersebut telah menyebar luas, sebagai akibat dari pemakaian antibiotik yang tidak rasional (Jawetz *et al.* 2010). Penggunaan obat dari bahan alam menjadi alternatif pengobatan untuk mengatasi disentri. Salah satu jenis

tanaman yang dapat digunakan sebagai obat adalah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.).

Belimbing wuluh merupakan tanaman yang berasal dari daerah yang beriklim tropis (Thomas, 2007). Tanaman belimbing wuluh dapat dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari. Bagian yang dapat digunakan diantaranya bunga, buah, daun, dan batangnya. Bunga belimbing wuluh dapat digunakan sebagai obat batuk dan sariawan. Buah belimbing wuluh dapat digunakan sebagai bumbu masak dapat juga digunakan sebagai obat menurunkan tekanan darah tinggi, gusi berdarah, jerawat dan batuk. Batang belimbing wuluh dapat digunakan sebagai obat sakit perut, sedangkan daunnya selain dapat digunakan sebagai penyedap rasa juga dapat digunakan sebagai obat batuk, obat kompres pada sakit gondokan, obat rematik, obat diare dan juga berpotensi sebagai antibakteri (Sudarsono *et al.* 2007).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh (Kusumadewi 2008) disebutkan bahwa kandungan flavonoid dalam ekstrak daun belimbing wuluh terbukti dapat menurunkan kadar gula darah sebesar  $(24,71 \pm 2,52)\%$  dan  $(36,65 \pm 2,99)\%$ . Selanjutnya dalam penelitian (Ummah 2010) yang menguji aktivitas antimikroba senyawa tanin dari daun belimbing wuluh pelarut aseton : air berpotensi menghambat bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Pada penelitian sebelumnya (Pendit *et al.* 2016) ekstrak dari daun belimbing wuluh dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* sebesar 13,13 mm dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* sebesar 8,69 mm.

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan berbagai metode, yaitu metode difusi dan dilusi. Penelitian ini menggunakan metode difusi untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri *Shigella dysenteriae* dengan cara melihat diameter zona hambat, sehingga dapat diketahui ekstrak atau fraksi teraktifnya. Ekstrak atau fraksi yang telah diketahui dilanjutkan dengan metode dilusi untuk menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM).

## **B. Perumusan Masalah**

Perumusan dari masalah penelitian ini adalah :

Pertama, apakah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* ?

Kedua, dari ketiga fraksi atau ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) tersebut manakah yang teraktif dalam menghambat *Shigella dysenteriae* ?

Ketiga, berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap *Shigella dysenteriae* ?

## **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah :

Pertama, untuk mengetahui ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae*.

Kedua, untuk mengetahui ketiga fraksi atau ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) tersebut yang teraktif dalam menghambat *Shigella dysenteriae*.

Ketiga, untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap *Shigella dysenteriae*.

## **D. Kegunaan Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang bermanfaat kepada masyarakat luas dan ilmu pengetahuan untuk pemanfaatan daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) sebagai obat antidisentri dan aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* dan sekaligus dimanfaatkan untuk mengatasi masalah kesehatan di Indonesia, dan juga sebagai pengobatan alternatif yang berasal dari bahan alam.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tanaman Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)**

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

Klasifikasi tanaman belimbing wuluh berdasarkan (Anonymous 2007) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

|         |                              |
|---------|------------------------------|
| Kingdom | : <i>Plantae</i>             |
| Divisio | : <i>Magnoliophyta</i>       |
| Kelas   | : <i>Magnoliopsida</i>       |
| Ordo    | : <i>Oxalidales</i>          |
| Famili  | : <i>Oxalidaceae</i>         |
| Genus   | : <i>Averrhoa</i>            |
| Spesies | : <i>Averrhoa bilimbi</i> L. |

##### **2. Nama daerah belimbing wuluh**

Belimbing wuluh dikenal dengan berbagai daerah dengan nama yang berbeda, seperti: limeng, selimeng (Aceh), selemeng (Gayo), asam belimbing, balimbingan (Batak), malimbi (Nias), balimbieng (Minangkabau), belimbing asam (Melayu), balimbing (Lampung), belimbing wuluh (Jawa), calincing wulet (Sunda), bhalingbhing bulu (Madura), blimbing buloh (Bali), limbi (Bima), libi (Sawu), balimbeng (Flores), belerang (Sangi), lumpias, rumpeasa dureng, wulidan, lopies, lembetue (Gorontalo), bainang (Makasar, calene (Bugis, takurela (Ambon), kerbol (Timor), malibi (Halmahera), uteke (Papua). Sedangkan dalam bahasa lain disebut *Averrhoa bilimbi* (Alamendah 2010).

##### **3. Morfologi tanaman**

Tanaman ini dapat tumbuh hingga mencapai tinggi 5 - 10 meter dengan batang utama yang pendek, letak cabang rendah, bergelombang dan diameter batang sekitar 30 cm. Pohon ini tumbuh di tempat yang terkena cahaya matahari langsung dan cukup lembab (Nugrahawati, 2009).

Daun belimbing wuluh berwarna hijau bersifat majemuk dan menyirip dengan 21 sampai 45 pasang berbentuk oral (Liantari, 2014). Daun belimbing

wuluh mengandung zat-zat aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau disebut zat antiaseptik sehingga sering dijadikan bahan obat. Zat-zat aktif yang terkandung dalam daun belimbing wuluh adalah flavonoid, saponin, dan tanin. Zat-zat aktif ini berdasarkan beberapa hasil penelitian mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Hayati *et al.* 2009).

Bentuk buah belimbing wuluh adalah bulat lonjong bersegi, panjang 4 sampai dengan 6,5 cm, warnanya hijau kekuningan, bila masak berair banyak, rasanya asam. Buah belimbing wuluh sering digunakan sebagai sirup penyegar, bahan penyedap masakan, membersihkan noda pada kain, mengkilapkan barang-barang yang terbuat dari kekuningan, membersihkan tangan yang kotor atau sebagai obat tradisional (Inyu 2006).

#### **4. Khasiat dan kegunaan**

Menurut empiris, belimbing wuluh berkhasiat sebagai obat jerawat, menghilangkan flek hitam pada wajah, sebagai obat panu, juga berkhasiat untuk rambut, serta dapat digunakan sebagai sikat gigi. Selain untuk kecantikan, belimbing wuluh juga berkhasiat untuk kesehatan, diantaranya berkhasiat untuk kesehatan, diantaranya berkhasiat untuk obat gondongan, obat ginjal, anti hipertensi, sebagai antioksidan, dapat menurunkan kolesterol, sebagai antibakteri, obat batuk, obat asam urat, antibakteri, antimikroba, dan digunakan bagi ibu hamil (Shanmugam 2006). Air daun belimbing wuluh dapat mengobati penyakit stroke karena ekstrak daun belimbing wuluh mengandung senyawa tanin, selain itu daun belimbing wuluh dapat dimanfaatkan sebagai obat sakit perut, rematik, perotitis, dan obat batuk (Arifiyani 2007). Daun belimbing wuluh dapat melancarkan pengeluaran empedu, anti radang, pereda nyeri (analgesik), astringen (Dalimarta 2008).

#### **5. Kandungan kimia belimbing wuluh**

Kandungan kimia pada belimbing wuluh adalah saponin, glukosida, sulfur, asam format, alkaloid, peroksida, asam amino, asam sitrat, senyawa fenolik, ion kalsium, gula dan vitamin. Identifikasi golongan pada ekstrak etanol dari buah belimbing wuluh menunjukkan senyawa flavonoid, triterpenoid (Lathifah 2008). Di dalam belimbing wuluh selain tanin juga mengandung

peroksidase, kalsium oksalat dan kalium sitrat. Bahan aktif pada daun belimbing wuluh yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tanin (Dalimarta 2008). Ekstrak daun belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin dan tanin (Faharani 2009).

**5.1 Flavonoid.** Flavonoid memiliki aktivitas antibakteri dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki kembali (Prayudhani *et al.* 2012). Senyawa flavonoid merupakan golongan senyawa fenol, diduga mekanisme kerjanya dengan mendenaturasikan protein sel dan merusak membran sel mikroorganisme. Suatu substansi yang dapat mendenaturasikan protein dan merusak sel tanpa dapat diperbaiki lagi sehingga pertumbuhan mikroba terhambat (Rinawati 2011).

**5.2 Saponin.** Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteri dengan menyebabkan sel bakterilisis, jadi mekanisme kerja saponin termasuk dalam kelompok antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida (Darsana *et al.* 2012).

**5.3 Tanin.** Mekanisme kerja antibakteri tanin atau polifenol juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Sari *et al.* 2011). Tanin di dalam tubuh akan berikatan dengan protein tubuh dan akan melapisi dinding usus, sehingga penyerapan lemak dihambat. Selain itu, tanin berfungsi melindungi usus terhadap asam lemak tak jenuh. Proses perlindungan yang dilakukan tanin berupa pematatan lapisan lendir saluran pencernaan sehingga menghambat penyerapan zat-zat makanan (termasuk lemak dan kolesterol) oleh saluran pencernaan. Tanin diketahui memacu metabolisme glukosa dan lemak, sehingga timbunan kedua sumber kalori dalam darah dapat dihindari, artinya kolesterol dan gula darah dapat turun (Kurnia dkk 2010).

## **B. Simplisia**

### **1. Pengertian Simplisia**

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai bahan obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Berdasarkan hal ini simplisia dibagi menjadi tiga golongan yaitu: simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa hewan utuh atau zat-zat berguna dihasilkan oleh hewan dan belum zat kimia murni. Simplisia mineral adalah simplisia berupa bahan pelicin atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Gunawan & Mulyani 2004).

### **2. Pencucian dan pengeringan simplisia**

Pencucian dilakukan untuk memisahkan kotoran atau bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih. Bahan simplisia yang mengandung zat mudah larut dalam air, pencucian agar dilakukan dalam waktu yang secepat mungkin (Prastowo 2013).

Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Penurunan mutu atau perusakan simplisia dapat dicegah dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik. Reaksi enzimatik tidak akan berlangsung bila kadar air dalam simplisia kurang dari 10%. Proses pengeringan sudah dapat menghentikan proses enzimatik dalam sel bila kadar airnya dapat mencapai kurang dari 10% (Prastowo 2013).

## **C. Metode Penyarian**

### **1. Pengertian ekstrak**

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai (Rahmawati 2010). Berdasarkan konsistensinya ekstrak dibagi menjadi tiga, yaitu ekstrak cair, kental, dan kering. Ekstrak cair merupakan sediaan cair hasil dari

penyarian simplisia. Ekstrak kental merupakan sediaan kental yang dibuat dari simplisia kemudian diuapkan pelarutnya. Ekstrak kering merupakan sediaan berbentuk bubuk yang dibuat dari hasil tarikan simplisia yang diuapkan menggunakan pelarut sampai kering (Khoirani 2013).

Ekstraksi merupakan sediaan kering, kental atau cair, dibuat dengan mengambil sari simplisia nabati atau hewani dengan cara yang sesuai, di luar pengaruh cahaya matahari langsung. Cairan penyari yang digunakan antara lain air, eter, atau campuran etanol air. Penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat menggunakan pelarut yang dipilih sehingga zat yang diinginkan larut. Bahan mentah obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan dan dikeringkan. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi untuk memperoleh ekstraksi yang sempurna dari obat. Sifat dari bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih suatu metode ekstraksi (Tiwari *et al.* 2011).

## **2. Metode maserasi**

Metode ekstraksi maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu kamar (Indraswari 2008). Metode ekstraksi maserasi dipilih karena memiliki banyak keuntungan dibandingkan metode ekstraksi lainnya. Keuntungan utama metode ekstraksi maserasi yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, metode maserasi tidak memerlukan pemanasan sehingga bahan alami tidak terurai. Ekstraksi dingin memungkinkan banyak senyawa terekstraksi, meskipun beberapa senyawa memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut ekstraksi pada suhu kamar (Istiqomah 2013).

## **3. Fraksinasi**

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dengan yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu herba. Mula-mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang



berbeda-beda polaritasnya. Masing-masing pelarut secara selektif memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut nonpolar, kemudian disari dengan pelarut semi polar dan yang terakhir dengan pelarut polar (Harborne 2007).

Fraksinasi bertingkat umumnya diawal dengan pelarut yang kurang polar dan dilanjutkan dengan pelarut yang lebih polar. Tingkat polaritas pelarut dapat ditentukan dari nilai konstanta dielektrik pelarut. Empat tahapan fraksinasi bertingkat dengan menggunakan empat macam pelarut yaitu ekstraksi etanol, fraksinasi *n*-heksan, etil asetat, dan air.

#### **4. Pelarut**

Pemilihan pelarut sangatlah penting tidak hanya tergantung pada kandungan zat aktif yang diselidiki, tetapi tergantung juga pada tempat terdapatnya dan substansi apa saja yang terkandung didalamnya. Pelarut adalah zat yang digunakan sebagai media untuk melarutkan zat lain. Pemilihan sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan seminimal mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Sunarya dan Setiabudi 2007). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol, *n*-heksan, etil asetat dan air.

**4.1 Etanol.** Etanol dipilih sebagai cairan penyari karena lebih selektif, kuman sulit tumbuh dalam etanol pada konsentrasi diatas 20%, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, dapat bercampur dengan air pada berbagai perbandingan, dan panas yang digunakan untuk pemekatan lebih kecil. Etanol lebih mudah menembus membran sel dalam mengekstrak bahan intraseluler dari bahan tanaman. Dapat juga menggunakan metanol, tetapi metanol lebih polar dibandingkan etanol, karena sifat metanol lebih sitotoksik, hal ini tidak cocok untuk beberapa penelitian karena mengakibatkan salah hasil (Tiwari *et al.* 2011).

**4.2 *n*-heksan.** *n*-heksan adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih, terdiri atas campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna, bersifat mudah terbakar, baunya khas, tidak dapat larut dalam air, dapat larut dalam alkohol, benzene, kloroform, dan eter. Senyawa yang dapat larut dalam *n*-heksan

yaitu senyawa yang bersifat polar seperti terpenoid, siterpenoid, sterol, dan fenil propanoid (Tiwari *et al.* 2011).

**4.3 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).

**4.4 Air.** Air adalah pelarut serba guna. Kemampuan air dalam melarutkan zat tersimpan dalam polaritas yang dimiliki oleh air. Air dapat melarutkan zat-zat yang bersifat ionik dan polar saja. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan, karena zat aktif ikut serta tersari sehingga zat lain yang tidak diperlukan mengganggu proses penyarian (Tiwari *et al.* 2011).

#### **D. *Shigella dysenteriae***

##### **1. Sistematika bakteri**

Menurut Leboffe & Pierce (2011), bakteri *Shigella dysenteriae* memiliki klasifikasi sebagai berikut:

|          |                               |
|----------|-------------------------------|
| Kerajaan | : Bacteria                    |
| Filum    | : Proteobacteria              |
| Kelas    | : Gamma Proteobacteria        |
| Bangsa   | : Enterobacteriales           |
| Suku     | : Enterobacteriaceae          |
| Marga    | : Shigella                    |
| Spesies  | : <i>Shigella dysenteriae</i> |

##### **2. Morfologi dan identifikasi *Shigella dysenteriae***

*Shigella dysenteriae* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang, tidak berkapsul, tidak berflagel, tidak membentuk spora, sifat fakultatif anaerobik, menghasilkan asam tetapi tidak menghasilkan gas. Bentuk kokobasil dapat terjadi pada biakan muda (Jawetz *et al.* 2010).

*Shigella dysenteriae* merupakan bakteri fakultatif anaerobik tetapi paling baik tumbuh pada kondisi aerob. Biakan bakteri memiliki koloni cembung, bundar dan transparan dan tepi berbatas tegas, mencapai diameter kira-kira 2 mm dalam 24 jam. *Shigella sp* mempunyai susunan antigen yang kompleks, terdapat banyak tumpang tindih dalam sifat serologik dari berbagai spesiesnya, dan sebagian besar memiliki antigen O yang juga dimiliki oleh bakteri enterik lainnya. Antigen somatik O bakteri ini adalah lipopolisakarida. Perbedaan serologiknya tergantung dari polisakarida. Klasifikasi *Shigella sp*. didasarkan pada sifat-sifat biokimia dan antigenik (Jawetz *et al.* 2012).

### **3. Patogenesis dan patologi**

Infeksi *Shigella* hampir selalu terbatas disaluran cerna, jarang terjadi invasi ke aliran darah. *Shigella* sangat mudah menular. Mikroabses pada dinding kolon ileum terminalis menyebabkan nekrosis membran mukosa, ulserasi superfisial, pendarahan dan terbentuknya pseudomembran pada area yang mengalami ulserasi. Mikroabses ini terdiri atas fibrin, leukosit, debris sel, membran mukosa nekrotik, dan bakteri. Saat proses ini mereda, jaringan granulasi mengisi ulkus dan terbentuk jaringan partu (Jawetz *et al.* 2012).

Bakteri *Shigella dysenteriae* menyebabkan kerusakan pada epitel usus besar, mengarah pada pembentukan micro ulcer, inflamasi eksudat, menyebabkan inflamasi sel (leukosit polimorf nuklear, PMN) dan darah muncul tinja. Bakteri ini masuk ke dalam tubuh manusia melalui air dan makanan yang telah tercemar bakteri disentri yang dikonsumsi. Sekali dikeluarkan, bakteri ini sangat sensitif terhadap kondisi lingkungan dan akan mati dengan cepat, terutama ketika kondisi kering atau terkena sinar matahari (Jawetz *et al.* 2010).

### **4. Gambaran klinik**

Setelah masa inkubasi yang singkat (1-2 hari), mendadak timbul nyeri abdomen, demam, dan diare cair. Diare disebabkan oleh kerja eksotoksin di usus halus. Sehari atau beberapa hari kemudian, saat infeksi mengenai ileum dan kolon, jumlah feses bertambah dan menjadi tidak terlalu cair, tetapi sering mengandung lendir dan darah. Pada anak-anak dan lansia, kehilangan cairan dan elektrolit dapat menyebabkan dehidrasi, asidosis, dan bahkan kematian. *Shigella*

*dysenteriae* dapat menyebabkan penyakit menjadi sangat parah (Jawetz *et al.* 2012).

Pada fase penyembuhan kebanyakan pasien hanya mengekresikan kuman disentri dalam periode yang singkat, tetapi beberapa diantaranya tetap menjadi pembawa kuman usus menahun dan dapat mengalami serangan penyakit berulang-ulang. Ketika sembuh dari infeksi, sebagian besar pasien membentuk antibodi terhadap *Shigella* dalam darah, tetapi antibodi ini tidak mencegah terjadinya infeksi ulang (Jawetz *et al.* 2012).

## **5. Pengobatan disentri**

Antibiotik terpilih untuk infeksi *Shigella* adalah ciprofloksasin, ampicilin, tetrasiklin, dan kotrimoksazol (Jawetz *et al.* 2010). Menurut pedoman WHO lini pertama untuk mengatasi infeksi *Shigella dysenteriae* adalah dengan pemberian antibiotik ciprofloksasin. Golongan kuinolon telah dilaporkan dapat menyebabkan artropati pada hewan belum dewasa, karena itu tidak disarankan penggunaannya pada anak dan remaja. Penggunaan kuinolon pada anak dapat dilakukan pada beberapa kondisi dengan mempertimbangkan munculnya efek samping kerusakan tulang sendi yang minimal dapat sebanding dengan efek farmakologi yang potensial untuk mengatasi penyakit yang dapat menyebabkan kematian jika tidak ditangani dengan segera (WHO 2005). Ciprofloksasin merupakan antibiotik berspektrum luas sehingga efektif untuk melawan bakteri Gram positif maupun negatif. Ciprofloksasin bekerja dengan menghambat aktivitas enzim DNA girase (topoisomerase II) sehingga menyebabkan kematian sel bakteri (Oliphant & Green 2002).

Pengobatan lini kedua dapat digunakan adalah seftriakson yang saat ini merupakan kondisi yang efektif untuk mengobati multi-resisten dari *Shigella sp.* pada semua usia. Azitromisin juga dipertimbangkan untuk pilihan alternatif pasien dewasa. Penggunaan obat-obat alternatif ini memiliki beberapa kekurangan yaitu harganya mahal (azitromisin), mudah menyebabkan resistensi (azitromisin), formulasinya (seftriakson harus dijelaskan), dan data efikasinya masih terbatas (seftriakson, azitromisin) (WHO 2005).

### **E. Media**

Media adalah tempat bagi jaringan untuk tumbuh dan mengambil nutrisi yang mengandung kehidupan jaringan. Media tumbuh menyediakan berbagai bahan yang diperlukan jaringan untuk memperbanyak diri. Mikroba dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik, di dalam media diperlukan persyaratan tertentu, yaitu media harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba. Media harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba. Media harus dalam keadaan steril artinya sebelum ditanami mikroba yang dimaksud, tidak ditumbuhi oleh mikroba lain (Abdurahman 2008).

Terdapat tiga bentuk media yaitu, media cair, padat dan setengah padat. Media cair dapat digunakan pembiakan organisme dalam jumlah besar, fermentasi dan berbagai uji. Media padat digunakan untuk mengamati bentuk dan morfologi koloni serta mengisolasi biakan murni. Media setengah padat atau media semisolid digunakan untuk menguji ada atau tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi (Sriyanti dan Wijayani 2008).

### **F. Sterilisasi**

Bahan atau peralatan yang dipergunakan di dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril sehingga dilakukannya proses sterilisasi. Sterilisasi adalah proses dimana semua bentuk dari mikroorganisme hidup, termasuk di dalamnya spora bakteri ditiadakan (Forbes *et al.* 2007). Sterilisasi dapat dilakukan dengan cara fisik dan cara kimia. Cara sterilisasi secara fisik yaitu pemijaran, pemanasan basah, pemanasan kering, radiasi ion, dan penyaringan atau filtrasi. Sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan uap formalin dan uap hidrogen peroksida (Forbes *et al.* 2007).

Sterilisasi dengan pemijaran (pemanasan api langsung) digunakan untuk alat-alat yang terbuat dari logam seperti jarum Ose dan pinset. Sterilisasi dengan cara pemanasan basah menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit, cara ini digunakan untuk sterilisasi media cair. Untuk sterilisasi alat-alat dari gelas digunakan cara sterilisasi media agar. Untuk sterilisasi alat-alat dari gelas

digunakan cara sterilisasi pemanasan kering yang menggunakan oven dengan suhu 160<sup>0</sup>C-180<sup>0</sup>C selama 1,5 sampai 3 jam. Sterilisasi dengan cara filtrasi (penyaringan) merupakan metode yang tepat untuk sterilisasi larutan antibiotik. Metode radiasi ion menggunakan sinar gamma digunakan untuk sterilisasi peralatan plastik sekali pakai seperti sarung tangan dan kateter. Sterilisasi secara kimia digunakan untuk sterilisasi inkas dengan menggunakan uap formalin (Forbes *et al.* 2007).

### **G. Kotrimoksazol**

Kotrimoksazol merupakan kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol digunakan dalam bentuk kombinasi karena sifatnya sinergistik. Trimetoprim dan sulfametoksazol menghambat reaksi enzimatik obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba. Spektrum antibakteri trimetoprim sama dengan sulfametoksazol. *Shigella sp.* merupakan salah satu mikroba yang peka terhadap kotrimoksazol. Mekanisme antibakterinya berdasar atas kerjanya pada tahap yang berurutan dalam reaksi enzimatik untuk membentuk asam tetrahidrofolat. Sulfametoksazol menghambat masuknya molekul PABA ke dalam asam folat dan trimetoprim menghambat terjadinya reaksi reduksi dari dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat. Tetrahidrofolat penting untuk reaksi-reaksi pemindahan satu atom C, seperti pembentukan basa purin dan beberapa asam amino. Trimetoprim menghambat enzim dihidrofolat reduktase mikroba secara sangat selektif. Kombinasi ini mungkin efektif walaupun mikroba telah resisten terhadap trimetoprim. Sinergisme maksimum akan terjadi bila mikroba peka terhadap kedua komponen (Gunawan *et al.* 2009).

### **H. Aktivitas Antibakteri**

#### **1. Definisi**

Antibakteri merupakan zat yang digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri. Zat-zat ini dapat diperoleh secara alami, melalui semisintesis, dan melalui modifikasi molekul biosintetik yang bekerja menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuh bakteri. Senyawa atau zat digunakan sebagai antibakteri, harus memiliki sifat toksitas selektif, maksudnya adalah senyawa tersebut berbahaya

bagi bakteri patogen tetapi tidak menimbulkan bahaya bagi hospes (Jawetz *et al.* 2010).

## **2. Mekanisme kerja antibakteri**

Mekanisme kerja antibakteri merupakan peristiwa penghambatan suatu bakteri oleh senyawa antibakteri. Berdasarkan mekanisme kerjanya dibagi menjadi 5 kelompok yaitu menghambat sintesis dinding sel bakteri, menghambat metabolisme sel bakteri, mengganggu keutuhan membran sel bakteri, menghambat sintesis protein sel bakteri, dan menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri.

**2.1 Menghambat sintesis dinding sel bakteri.** Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini ialah penisilin, sefalosporin, basitrasin, vankomisin, dan sikloserin. Dinding sel bakteri terdiri dari polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Sikloserin menghambat reaksi yang paling dini dalam proses sintesis sel dinding: diikuti berturut-turut oleh basitrasin, vankomisin, dan diakhiri oleh penisilin, dan sefalosporin, yang menghambat reaksi terakhir (transpeptidase) dalam rangkaian reaksi tersebut. Tekanan osmotik dalam sel kuman lebih tinggi daripada di luar sel maka kerusakan dinding sel kuman akan menyebabkan terjadinya lisis, yang merupakan dasar efek bakterisidal pada kuman yang peka (Akhyar 2010).

**2.2 Menghambat metabolisme sel bakteri.** Bakteri membutuhkan asam folat untuk hidup, sehingga harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoate (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antibakteri bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat nonfungsional, sehingga kebutuhan asam folat tidak terpenuhi, hal ini bisa menyebabkan kematian bakteri. Contoh antibiotik yang bekerja menghambat metabolisme sel adalah sulfonamida dan trimetoprim (Permatawati 2015).

**2.3 Mengganggu keutuhan membran sel bakteri.** Sel bakteri dikelilingi oleh struktur kaku yang disebut dinding sel, yang melindungi sitoplasma baik osmotik maupun mekanik. Setiap zat yang dapat merusak dinding sel atau mencegah sintesisnya akan menyebabkan terbentuknya sel-sel yang peka terhadap

osmotik. Adanya tekanan dalam sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis yang merupakan dasar efek bakterisidal pada bakteri yang peka (Maryuni 2008).

**2.4 Menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri.** Salah satu mekanisme kerja yang dimiliki oleh anti bakteri ini adalah menghalangi sintesis DNA dengan cara memblokir DNA girase, contohnya adalah antibiotik kuinolon dan fluorokuinolon. Rifampin bekerja membentuk ikatan dengan enzim polymerase RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut (Jawetz *et al.* 2010).

**2.5 Menghambat sintesis protein sel bakteri.** Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah golongan aminoglikosid, makrolid, linkomisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol. Sel mikroba perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan berbagai cara yaitu antara lain: linkomisin berikatan dengan komponen ribosom 50S dan menghambat sintesis protein. Tetrasiklin berikatan dengan ribosom 30S dan menghalangi masuknya kompleks tRNA asam amino pada lokasi asam amino. Streptomisin berikatan dengan komponen ribosom 30S dan menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein, akibatnya akan dibentuk protein yang abnormal dan non fungsional pada sel bakteri. Kloramfenikol berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat peningkatan asam amino baru pada rantai polipeptida oleh enzim peptidil transferase (Akhyar 2010).

## I. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri suatu zat digunakan untuk mengetahui kemampuan zat tersebut dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri uji. Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan berbagai metode, yaitu metode difusi dan dilusi (Jawetz *et al.* 2010).

### 1. Metode difusi

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi. Metode difusi dilakukan dengan menggunakan cakram (*disk*) kertas saring, sumuran atau silinder tidak beralas. Metode dengan sumuran atau silinder, dilakukan dengan



memasukkan larutan uji dengan konsentrasi tertentu ke dalam sumuran. Metode cakram kertas saring berisi sejumlah obat yang ditempatkan pada permukaan medium padat, medium sebelum diolesi bakteri uji. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat. Metode difusi agar dipengaruhi oleh faktor kimia, faktor antar obat dan organisme (Jawetz *et al.* 2012).

Kerugian dari metode difusi adalah tidak dapat mengukur secara kuantitatif Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM), sedangkan keuntungannya adalah praktis, cepat, dan dapat digunakan untuk menguji beberapa agen antimikroba dalam satu waktu terhadap suatu mikroba (Setianingrum 2010).

## **2. Metode dilusi**

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode dilusi. Metode dilusi ini berdasarkan pengamatan kekeruhan larutan, dengan metode dilusi dapat ditentukan secara kuantitatif KHM dan KBM. Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap pada media cair maupun padat. Media diinokulasikan terhadap mikroba 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. Kekurangan metode dilusi adalah dapat mempersulit pengamatan, membutuhkan alat yang banyak dan tidak praktis (Jawetz *et al.* 2012).

## **J. Landasan Teori**

*Shigella dysenteriae* merupakan bakteri Gram negatif. *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri patogen karena menghasilkan endotoksin dan eksotoksin, dimana keduanya bekerja secara berurutan. Eksotoksin menyebabkan diare akut dan tidak disertai darah pada tinja kemudian invasi pada usus besar yang disebabkan endotoksin sehingga terjadilah disentri, yaitu diare akut yang disertai darah dengan atau tanpa lendir dalam feses (Jawetz *et al.* 2010).

Pada penelitian Riong *et al.* 2016 telah dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi 100% pada ekstrak etanol 70% dari daun belimbing wuluh menghasilkan zona hambat yaitu 14,47 mm. Zona hambat dari ekstrak jika dibandingkan dengan kontrol positif berupa ciprofloxacin menghasilkan zona hambat sebesar 38,02 mm, memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kecil.

Ekstrak etanol 70% dari daun belimbing wuluh mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* disebabkan karena adanya metabolit sekunder yang dihasilkan yang terdapat pada daun belimbing wuluh seperti flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid. Senyawa kimia tersebut memiliki aktivitas antibakteri. Senyawa alkaloid dapat bereaksi dengan asam amino penyusun dinding sel dan DNA bakteri. Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino bakteri karena sebagian asam amino telah bereaksi dengan gugus basa dari alkaloid. Perubahan susunan asam amino pada DNA akan mengakibatkan perubahan keseimbangan genetik pada asam amino DNA sehingga DNA bakteri akan mengalami kerusakan. Kerusakan tersebut akan mendorong terjadinya lisis pada inti sel bakteri (Riong *et al.* 2016).

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama, kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. *n*-heksan dapat melarutkan senyawa-senyawa nonpolar, misalnya golongan kandungan kimia minyak atsiri, lemak, asam lemak tinggi, steroid, triterpenoid, dan karetenoid (Tiwari *et al.* 2011). Etil asetat merupakan senyawa semi polar dan dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan triterpenoid (Putri *et al.* 2013). Air dapat melarutkan zat-zat yang bersifat ionik dan polar saja, misalnya gula, pati, protein, enzim, lendir, lilin, lemak, peptida, garam alkaloid, zat warna dan asam organik (Tiwari *et al.* 2011).

Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas *Shigella dysenteriae* adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi dilakukan dengan menggunakan cakram (*disk*) kertas saring, sumuran atau silinder tidak beralas. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat (Jawetz *et al.* 2012). Metode dilusi dapat ditentukan secara kuantitatif KHM dan

KBM. Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap pada media cair maupun padat. Media diinokulasikan terhadap mikroba uji, selanjutnya diinkubasi dan diamati konsentrasi antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji (Jawetz *et al.* 2010).

### **K. Hipotesis**

Berdasarkan landasan teori yang ada, disusun hipotesis dalam penelitian ini adalah :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae*.

Kedua, dari ketiga fraksi daun belimbing wuluh diperoleh fraksi yang paling efektif menghambat *Shigella dysenteriae* yaitu fraksi etil asetat.

Ketiga, dapat menentukan nilai konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap *Shigella dysenteriae*.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

##### **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang diambil dari daerah Surakarta, Jawa Tengah.

##### **2. Sampel**

Sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Tanaman belimbing wuluh yang diambil secara acak dengan memilih daun berwarna hijau, segar, dan tidak rusak yang diambil dari daerah Surakarta, Jawa Tengah.

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

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

Variabel utama pertama adalah serbuk daun belimbing wuluh yang di ekstraksi dengan etanol 70% dilanjutkan dengan fraksinasi yang menggunakan *n*-heksan sebagai pelarut non polar, etil asetat sebagai pelarut semi polar dan air sebagai pelarut polar.

Variabel utama kedua adalah aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksan, etil asetat, air dan ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*.

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

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel utama yang sengaja diubah-ubah untuk pengaruhnya terhadap variabel tergantung berkaitan dengan perubahan-perubahan. Variabel bebas yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun belimbing wuluh dalam berbagai konsentrasi.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu dinetralkan atau ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti secara cepat dan tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Shigella dysenteriae*, kondisi laboratorium (meliputi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), serta media yang digunakan dalam penelitian.

Variabel terikat merupakan titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang dipengaruhi oleh fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak daun belimbing wuluh.

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

Pertama, daun belimbing wuluh adalah daun pada tanaman belimbing wuluh berwarna hijau, segar dan tidak rusak yang diperoleh dari daerah Surakarta, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun belimbing wuluh adalah serbuk yang diperoleh dari daun belimbing wuluh yang sudah dicuci bersih, dijemur, dipotong-potong dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40<sup>o</sup>C. Selanjutnya di blender dan diayak dengan pengayak nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun belimbing wuluh adalah hasil ekstraksi dari daun belimbing wuluh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% lalu dipekatkan dengan evaporator.

Keempat, fraksi *n*-heksan daun belimbing wuluh adalah hasil fraksinasi dari ekstrak etanol menggunakan pelarut *n*-heksan.

Kelima, fraksi etil asetat daun belimbing wuluh adalah hasil fraksinasi dari residu *n*-heksan dengan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air dari daun belimbing wuluh adalah residu dari hasil fraksinasi ekstrak etil asetat dengan pelarut air.

Ketujuh, bakteri yang digunakan dalam penelitian yaitu *Shigella dysenteriae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi yaitu mengukur luas daerah hambatan yaitu daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri menggunakan kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif antibiotik kotrimoksazol. Metode dilusi yaitu berupa seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi dengan cara penapisan sampai konsentrasi akhir sebagai berikut: 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%; yaitu kontrol negatif adalah suspensi bakteri dan kontrol positif adalah fraksi teraktif.

### **C. Bahan dan Alat**

#### **1. Bahan**

Bahan sampel yang digunakan adalah daun belimbing wuluh yang masih berwarna hijau, bakteri uji *Shigella dysenteriae*. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah SIM (*sulfida Indol Motility*), KIA (*Kliger's Iron Agar*), LIA (*Lysin Iron Agar*), MHA (*Mueller Hinton Agar*), SSA (*Salmonella Shigella Agar*) dan BHI (*Brain Heart Infusion*).

Bahan kimia yang digunakan adalah pelarut *n*-heksan, etil asetat, etanol 70%, HCl pekat, FeCl<sub>3</sub> 1%, reagen Mayer, reagen Dragendroff, antibiotik kotrimoksazol, spiritus, blank paper disc, aquadest, pelarut DMSO 5%, dan larutan standart Mc Farland 0,5.

#### **2. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, timbangan, blender, cawan penguap, desikator, corong pisah, mikropipet, cawan petri steril, jarum ose, inkas, korek api, tabung reaksi, gelas ukur, botol kaca gelap, beaker gelas, kertas saring, kertas label, stopwatch, lampu spiritus, waterbath, Rotary evaporator, erlenmeyer, objek glass, labu takar, mikroskop binokuler, mikropipet, pipet volume, rak tabung reaksi, kapas lidi steril, vortex, ayakan nomor 40, alat maserasi, kain flannel, neraca elektrik, pipet.

## **D. Rencana Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi yang dilakukan dalam penelitian ini bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan mencocokkan ciri mikroskopis dan makroskopis, serta mencocokkan ciri morfologi yang ada pada tanaman daun belimbing wuluh. Determinasi dilakukan di Laboratorium Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.

### **2. Pembuatan serbuk daun belimbing wuluh**

Daun belimbing wuluh yang telah dipilih kemudian dicuci dengan air untuk membersihkan kotoran yang menempel, lalu ditiriskan kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40<sup>0</sup>C. Pengeringan dilakukan bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama. Daun belimbing wuluh yang telah kering kemudian digiling dan diayak dengan ayakan nomor 40 sampai serbuk terayak habis, kemudian dilakukan perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah. Hasil penyerbukan yang berupa serbuk kering disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat yang selanjutnya digunakan untuk melakukan penelitian.

### **3. Penetapan kadar lembab**

Penetapan kadar kelembaban serbuk daun belimbing wuluh pada penelitian ini dilakukan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Penetapan kadar kelembaban serbuk daun belimbing wuluh 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 daun belimbing wuluh**

Ekstraksi dilakukan dengan menimbang serbuk daun belimbing wuluh sebanyak 500 gram lalu dimasukkan dalam botol coklat kemudian ditambah dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3750 ml dan didiamkan selama 5 hari dengan sesekali digojog. Kemudian dibilas dengan ditambah etanol 70% sebanyak

1250 ml. Filtrat dan ampas dipisahkan dengan menggunakan kain flanel. Filtrat yang didapat dipekatkan dengan *rotary evaporator* kemudian di oven pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental daun belimbing wuluh.

### **5. Uji bebas etanol**

Ekstrak yang telah pekat di uji 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 eter yang khas dari etanol. Tujuan dilakukannya tes bebas etanol ini bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri (Kurniawati 2015).

### **6. Fraksinasi**

Fraksinasi dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh yang telah dikentalkan dengan cara menimbang ekstrak etanol kental dari hasil maserasi. Ekstrak kental 10 gram dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 5 ml dan ditambahkan *n*-heksan 75 ml kemudian digojok dan dipisahkan di corong pisah, dilakukan sebanyak tiga kali. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan disebut sebagai fraksi *n*-heksan.

Residu dari fraksinasi *n*-heksan dipisahkan di corong pisah dengan ditambahkan etil asetat 75 ml dan dilakukan sebanyak tiga kali. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* kemudian ditimbang dan disebut sebagai fraksi etil asetat.

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

### **7. Identifikasi kandungan senyawa kimia**

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk mendapatkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam daun belimbing wuluh. Identifikasi senyawa flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid yang dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi, Surakarta.



**7.1 Uji flavonoid.** Identifikasi flavonoid dilakukan dengan diambil 1 gram tiap serbuk, ekstrak dan fraksi daun belimbing wuluh, dimasukkan kedalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 1 ml air dipanaskan selama 15 menit kemudian disaring. Filtratnya ditambahkan serbuk magnesium (MG) secukupnya dan 1 ml asam klorida pekat (HCl) pada tiap tabung. Sampel dinyatakan positif apabila berwarna kuning pada larutan (Puspasari *et al.* 2014).

**7.2 Uji tanin.** Identifikasi tanin dilakukan dengan diambil 1 gram tiap serbuk, ekstrak dan fraksi daun belimbing wuluh, dimasukkan kedalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 1 ml air dipanaskan selama 15 menit kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 3 tetes  $\text{FeCl}_3$  1% pada tiap tabung. Hasil positif ditunjukkan terbentuk warna hijau kehitaman (Setyowati dkk 2014).

**7.3 Uji saponin.** Identifikasi saponin dilakukan dengan diambil 1 gram tiap serbuk, ekstrak dan fraksi daun belimbing wuluh, dimasukkan kedalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 1 ml air dipanaskan selama 15 menit kemudian disaring. Filtrat kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan terbentuknya busa stabil setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Setyowati dkk 2014).

**7.4 Uji alkaloid.** Identifikasi alkaloid dilakukan dengan diambil 1 gram tiap serbuk, ekstrak dan fraksi daun belimbing wuluh, dimasukkan kedalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 1 ml air dipanaskan selama 15 menit kemudian disaring. Setelah itu ditambahkan 1 ml HCl 2 N. Dibuat dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambahkan reagen Mayer terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan. Tabung 2 ditambahkan reagen Dragendroff terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Alamsyah 2014).

## **8. Sterilisasi**

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi, kapas lidi, dan beaker glass disterilisasi dengan oven pada suhu  $170^{\circ}\text{C}$ - $180^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan langsung.

## 9. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri *Shigella dysenteriae* dalam biakan murni diambil satu ose dan dimasukkan kedalam tabung yang telah berisi media BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24-48 jam. Suspensi yang didapat 1 ose dimasukkan dalam BHI dan distandarkan dengan Mc Farland 0,5. Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah sel bakteri.

## 10. Identifikasi bakteri uji *Shigella dysenteriae*

**10.1 Identifikasi bakteri secara goresan.** Bakteri *Shigella dysenteriae* diinokulasikan, pada media SSA dalam cawan petri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Penampakan koloni yang terjadi yaitu kecil, halus, tidak berwarna, tepi, dan permukaan rata.

**10.2 Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram.** Bakteri *Shigella dysenteriae* pada pengamatan koloni, diambil satu ose kemudian dioleskan pada objek glass. Apusan bakteri pada objek glass ditetesi dengan Gram A (larutan violet) ± 1 menit kemudian dibilas dengan aquadest, ditetesi lagi dengan Gram B (lugol's iodine) ± 1 menit kemudian dibilas dengan aquadest, ditetesi lagi dengan Gram C (etanol 70%) ± 1 menit kemudian dibilas dengan aquadest, ditetesi lagi dengan Gram D (safranin) didiamkan ± 1 menit kemudian dibilas dengan aquadest. Kemudian apusan bakteri pada objek glass yang telah dilakukan pengecatan dilihat di mikroskop.

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

**10.3.1 Media SIM (*Sulfida Indol Motility*).** Suspensi bakteri diinokulasikan pada media SIM dengan cara ditusukan, kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Tujuan dilakukannya uji adalah untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida bernilai positif jika berwarna hitam, uji indol bernilai positif jika setelah ditambahkan dengan reagen Erlich A dan B menghasilkan warna merah, uji motilitas bernilai positif jika terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Hasil uji SIM pada *Shigella* yaitu *Sulfida* (-), *Indol* (+) atau (-), *Motility* (-).

**10.3.2 Media KIA (*Kliger's Iron Agar*).** Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dengan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Pengamatan dilakukan pada bagian lereng dan dasar media, adanya gas dan sulfida. Hasil pada bagian lereng dan dasar dapat berwarna merah yang berarti basa (ditulis K), atau kuning yang berarti susunannya asam (ditulis A), terbentuk gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+) (Raihana 2011). Pada *Shigella dysenteriae* hasilnya K/A S- artinya terbentuk warna merah kuning serta tidak terbentuk warna hitam (sulfida).

**10.3.3 Media LIA (*Lysin Iron Agar*).** Biakan bakteri diinokulasikan dengan cara ditusukan dan kemudian digores selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi berfungsi untuk menguji lisin dan sulfida. Selanjutnya diamati bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka pada lereng berwarna coklat (ditulis R), berwarna ungu (ditulis K), berwarna kuning (ditulis A), serta terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+). Hasil pengujian media LIA pada bakteri *Shigella dysenteriae* didapatkan hasil pada lereng berwarna ungu dan pada bagian dasar berwarna kuning dan tidak didapatkan warna hitam pada media. Hasil uji tersebut dapat dituliskan (K/A S-).

**10.3.4 Media Citrat.** Biakan bakteri diinokulasikan media dengan cara goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila berwarna biru. Pada *Shigella dysenteriae* hasil pada media sitrat (-) atau terbentuk warna hijau.

## **11. Pengujian aktivitas antibakteri daun belimbing wuluh**

**11.1 Pengujian antibakteri secara difusi.** Metode yang digunakan adalah metode difusi dengan cara suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* diulas secara merata dengan menggunakan kapas lidi steril pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) di diamkan selama 5 menit agar bakteri tersuspensi. Selanjutnya, cakram dilakukan dengan merendam DMSO 5% sebagai kontrol negatif dan kontrol

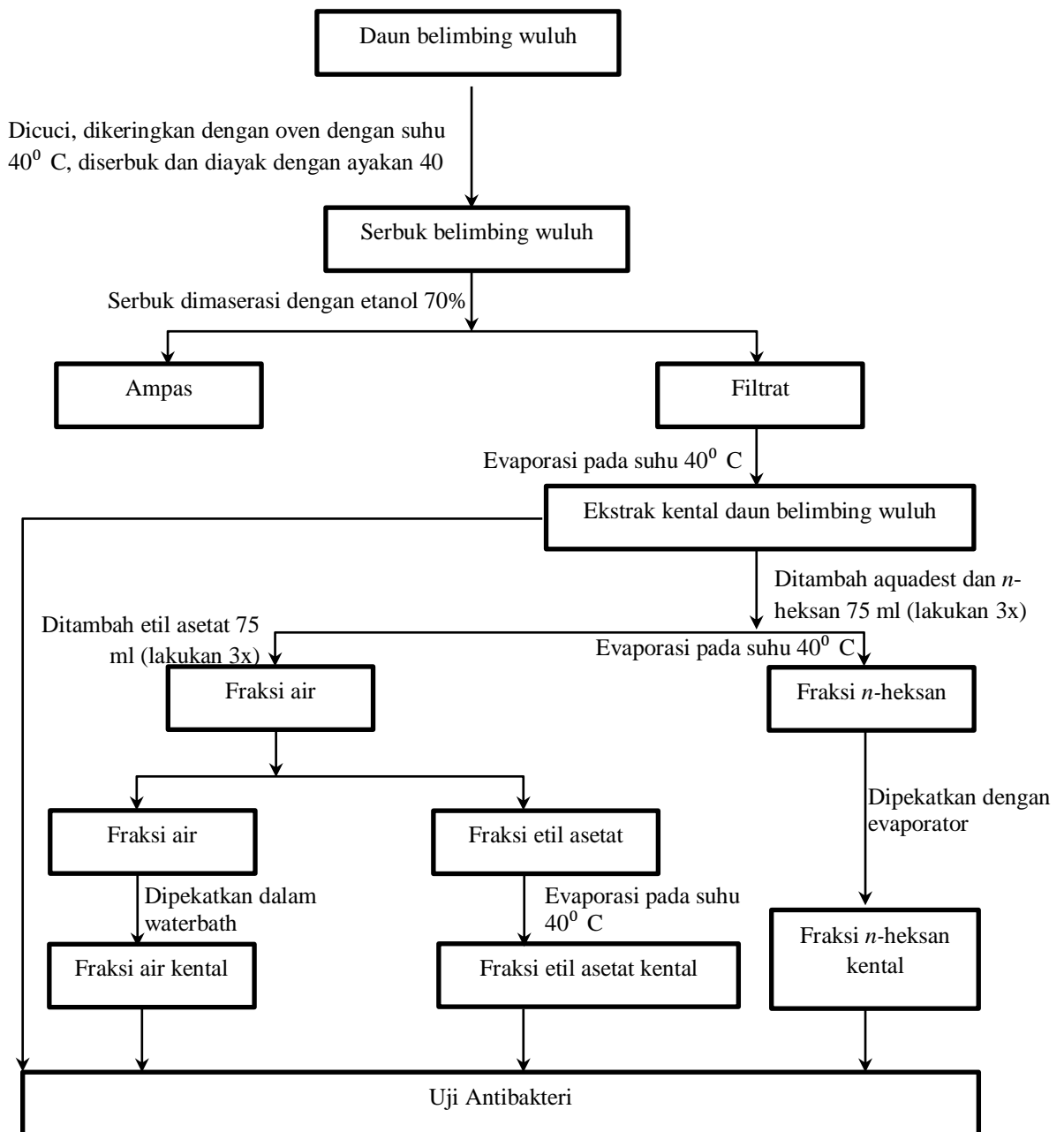
positif yang digunakan suspensi kotrimoksazol dan larutan uji yaitu ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun belimbing wuluh. Cawan petri bagi menjadi enam bagian dan masukkan cakram berisi larutan uji ke dalam masing-masing bagian, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Daerah jernih pada sekitar cakram diukur diameter hambatnya. Konsentrasi fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air yang digunakan adalah 50%; 25%; dan 12,5% dengan dilakukan 3 kali replikasi. Daerah jernih disekitar cakram diukur dan hasilnya adalah sebagai diameter zona hambat bakteri.

**11.2 Pengujian antibakteri secara dilusi.** Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah sediaan yang dapat menghambat dan membunuh bakteri uji. Metode dilusi dilakukan dengan cara deretan tabung yang terdiri dari 12 tabung steril dengan konsentrasi satu seri pengenceran yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%; larutan stok fraksi sebagai kontrol negatif (-) dan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* sebagai kontrol positif (+). Pembuatan larutan stok fraksi teraktif menggunakan pelarut DMSO 5%. Pengujian dilakukan secara aseptis, medium BHI dimasukkan 1 ml pada tabung 3 hingga tabung 11, kemudian masukkan 2 ml larutan stok fraksi aktif ke dalam tabung 1 sebagai kontrol negatif (-), dipipet 1 ml larutan stok dimasukkan ke dalam tabung 2, kemudian dipipet 1 ml dari tabung 3 dimasukkan ke dalam tabung 4, lakukan hal yang sama begitu seterusnya hingga tabung 11 kemudian dibuang 1 ml, biakan bakteri *Shigella dysenteriae* dimasukkan ke tabung 2 sampai 11 sebanyak 1 ml yang telah diinkubasi. Tabung 12 sebagai kontrol positif. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media SSA untuk masing-masing bakteri uji. Bakteri yang sudah digoreskan pada media SSA 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) ditentukan dari goresan larutan uji pada medium SSA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati ada tidaknya

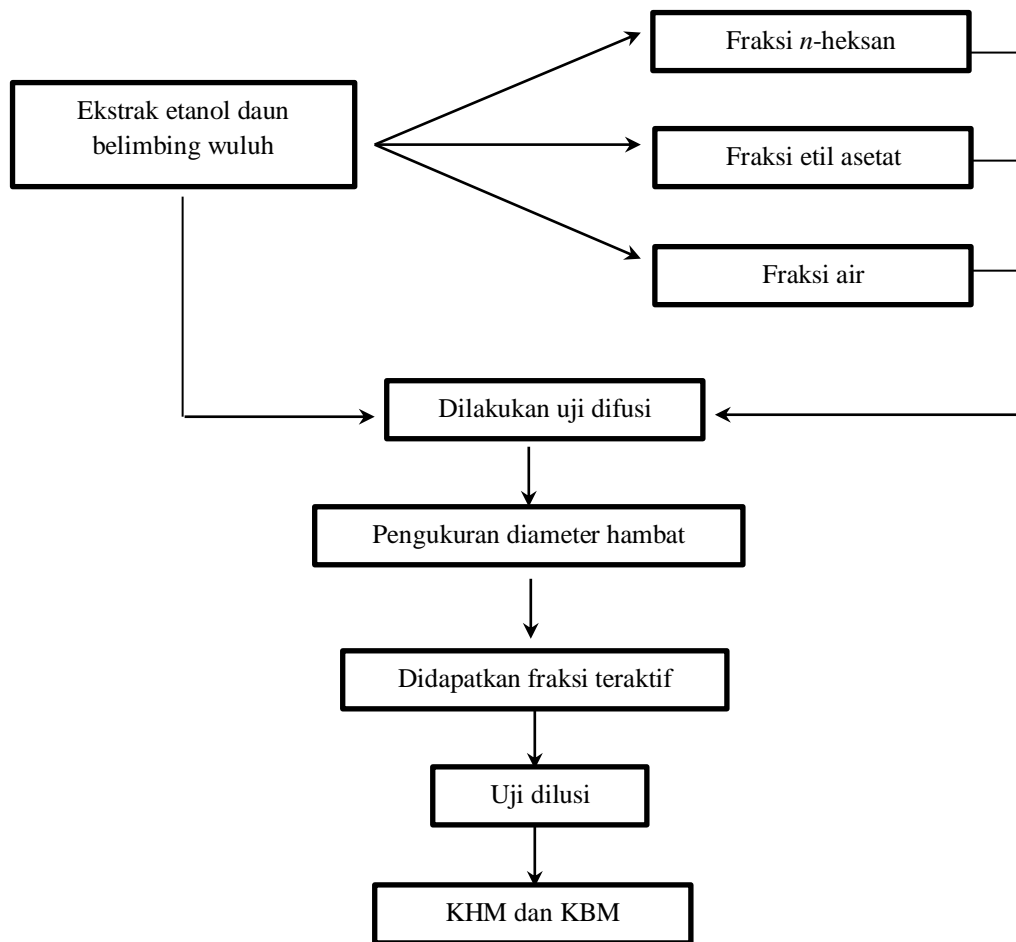
pertumbuhan pada goresan bakteri, sehingga KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dapat diketahui. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

### **E. Analisis Hasil**

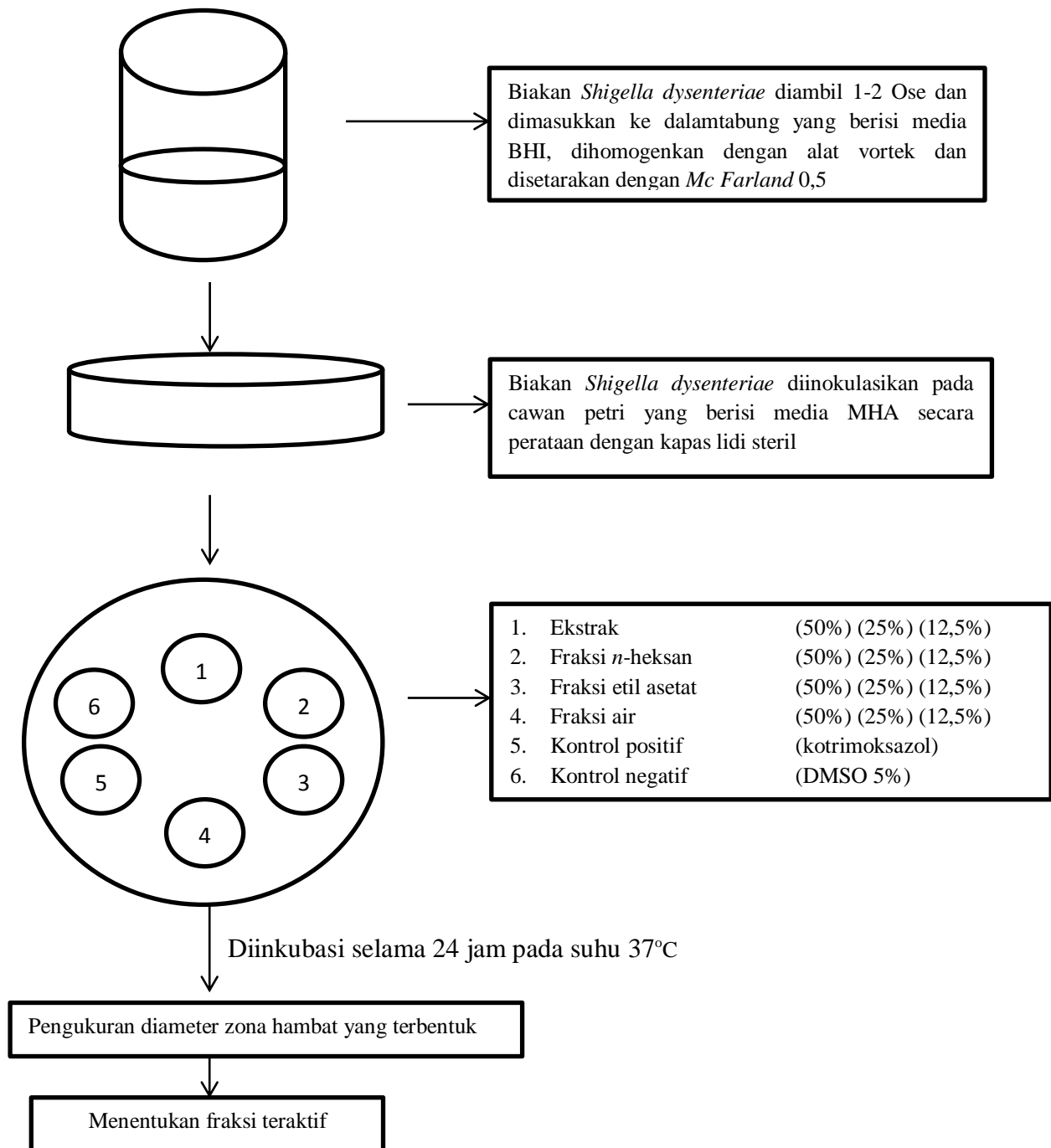
Hasil penelitian ini diamati berdasarkan diameter daerah hambat yang menunjukkan adanya daerah bening disekeliling cakram yang tidak ditumbuhi bakteri, kemudian diukur diameter hambatan pertumbuhan bakterinya dari masing-masing lingkaran. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan *Kolmogorov-smirnov*, jika terdistribusi secara normal kemudian dilanjutkan dengan analisa of varian (ANOVA) *one way*.



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun belimbing wuluh

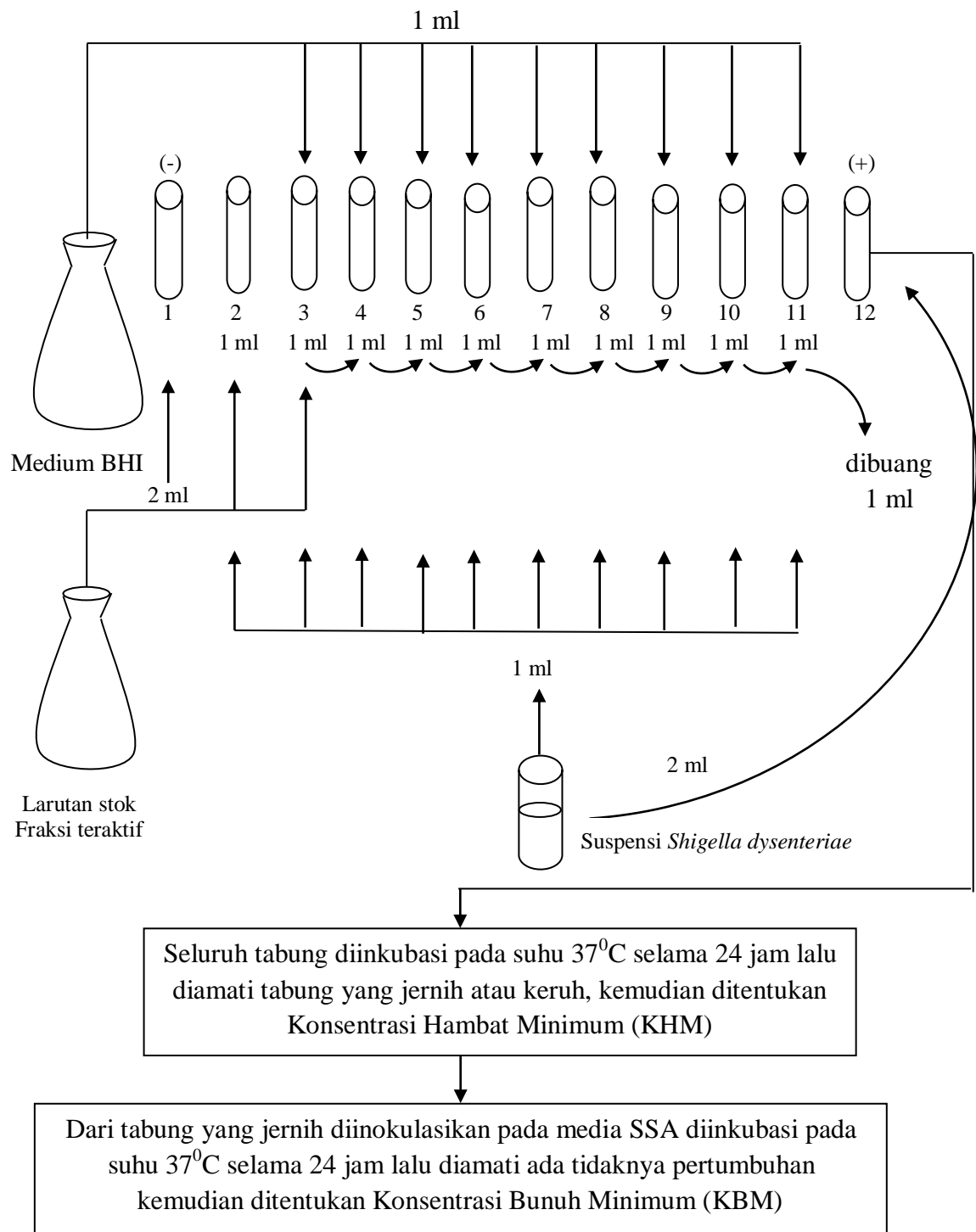


Gambar 2. Skema uji aktivitas antibakteri



**Gambar 3.** Skema pengujian aktivitas daun belimbing wuluh terhadap *Shigella dysenteriae* secara difusi





**Gambar 4.** Skema pengujian aktivitas daun belimbing wuluh terhadap *Shigella dysenteriae* secara dilusi

**BAB IV**  
**HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

**A. Hasil Penelitian**

**1. Hasil identifikasi tanaman daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)**

**1.1 Determinasi tanaman.** Tujuan dilakukan determinasi adalah untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman belimbing wuluh terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.

Hasil determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963): 1b-2b-3b-4b-12b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74a-75b-76a-77a-103c-104b-106b-107a-108b-109a-110a-111b-112a-113a\_\_\_\_\_ **53.Oxalidaceae**

1a\_\_\_\_\_ **3. Averrhoa**

1b\_\_\_\_\_ ***Averrhoa bilimbi* L.**

**1.2 Deskripsi Tanaman.** Habitus : pohon, menahun, tumbuh tegak, tinggi 5-15 m. Akar : tunggang, bercabang, putih kotor atau putih kekuningan. Batang : bentuk bulat, berkayu, permukaan batang kasar berbenjol-benjol; percabangan sedikit, arahnya condong ke atas, cabang muda berambut halus seperti beledru, warnanya coklat muda. Daun : tersusun spiral, meninggalkan bekas dan berbentuk jantung atau ginjal pada batang atau cabang, daun majemuk menyirip ganjil dengan 21-45 pasang anak daun; anak daun bertangkai pendek, bentuk bulat telur sampai jorong atau memanjang, panjang 2-10 cm, lebar 1.2-3 cm, ujung runcing, pangkal membulat, tepi rata, permukaan malai menggantung, berkelompok, keluar dari batang atau percabangan yang besar, panjang perbungaan 5-20 cm, bunga kecil-kecil berbentuk bintang; kelopak bunga 5-7 mm, hijau; daun mahkota bunga bentuk lanset atau spatula, hampir bergandengan atau tidak, panjang 13-20 mm, ungu gelap sampai ungu kemerahan tapi lebih pucat pada bagian pangkalnya; benang sari 10, semuanya fertil, yang

berhadapan dengan daun mahkota bunga akan menjadi staminodia (steril), panjang 3-4 cm; putik dengan tangkai putik yang sama panjangnya (*homostylus*). Buah : buah buni, bentuknya bulat lonjong bersegi, panjang 4-6.5 cm, beruang 5, tiap ruangan berisi 2-3 biji, warnanya hijau kekuningan, bila masak berair banyak, rasanya asam. Biji : bentuknya bulat telur, gepeng, panjang 6-7 mm.

Berdasarkan hasil determinasi dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Gambar dapat dilihat pada lampiran 1.

## 2. Hasil pembuatan serbuk daun belimbing wuluh

Hasil pembuatan serbuk daun belimbing wuluh diperoleh prosentase seperti yang tercantum pada tabel 1 di bawah ini.

**Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh**

| No | bobot basah (g) | bobot kering (g) | rendemen(%) |
|----|-----------------|------------------|-------------|
| 1. | 6000            | 1700             | 28,33       |

Tabel 1 menunjukkan bahwa daun belimbing wuluh dengan bobot basah 6000 gram dikeringkan dan diperoleh bobot kering yaitu 1700 gram. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah sebesar 28,33%. Perhitungan prosentase bobot basah terhadap bobot kering dapat dilihat pada lampiran 13.

## 3. Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh

Penetapan kadar lembab daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menggunakan alat *Moisture Balance*. Hasil penetapannya tercantum pada tabel di bawah ini

**Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab daun belimbing wuluh**

| No               | Bobot serbuk (gram) | Kadar lembab (%) |
|------------------|---------------------|------------------|
| 1                | 2,00                | 6,7              |
| 2                | 2,00                | 5,7              |
| 3                | 2,00                | 6,7              |
| <b>Rata-rata</b> |                     | 6,36             |

Berdasarkan tabel 2 hasil hitungan kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh yang dilakukan 3 kali replikasi, didapatkan prosentase kadar lembab 6,36%. Kadar lembab tidak boleh lebih dari 10%, kadar lembab yang terlalu tinggi dapat merubah komposisi kimia dari simplisia sehingga menurunkan kualitas simplisia tersebut. Air merupakan media tumbuhnya mikroorganisme yang dapat merusak simplisia. Berdasarkan dari penetapan kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh dapat disimpulkan bahwa serbuk daun belimbing wuluh ini

memenuhi syarat karena prosentase kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh kurang dari 10%. Perhitungan penetapan kadar lembab daun belimbing wuluh dapat dilihat pada lampiran 14.

#### 4. Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun belimbing wuluh

Pembuatan ekstrak etanol dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi, maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Keuntungan cara penyari dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Metode maserasi tidak menggunakan pemanasan sehingga komponen yang tidak tahan panas seperti flavonoid tetap ada di dalam ekstrak. Hasil pembuatan ekstrak kental maserasi daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun belimbing wuluh**

| Bahan sampel | Bobot ekstrak (gram) | Rendemen ekstrak (b/b%) |
|--------------|----------------------|-------------------------|
| 500          | 30,95                | 6,19                    |

Berdasarkan tabel 3 prosentase rendemen ekstrak maserasi daun belimbing wuluh yang diperoleh sebanyak 6,19%. Ekstrak tersebut kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Hasil perhitungan ekstrak daun belimbing wuluh dapat dilihat pada lampiran 15.

#### 5. Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi daun daun belimbing wuluh

Ekstrak daun belimbing wuluh dilakukan tes bebas etanol dengan melakukan uji esterifikasi alkohol. Hasil tes bebas etanol ekstrak daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi belimbing wuluh**

| Prosedur  | Hasil   | Pustaka                                       |
|---|---|---|
| Ekstrak + $H_2SO_{4conc} + CH_3COOH$ , dipanaskan | Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol | Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol |

Hasil tes bebas etanol pada tabel 4 menunjukkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh tersebut sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 70 % yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol. Hasil tes bebas etanol adalah untuk membuktikan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh sudah tidak mengandung etanol.

## 6. Hasil fraksinasi ekstrak daun belimbing wuluh

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawanya yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda.

Senyawa non polar akan terekstraksi dalam pelarut *n*-heksana, senyawa semipolar akan terekstraksi dalam pelarut etil asetat, dan senyawa polar akan terekstraksi dalam pelarut air. Bahan aktif yang sudah terekstraksi dalam masing-masing pelarut yang sesuai dengan kepolarannya akan mudah diperkirakan kandungan kimia yang dapat digunakan sebagai antibakteri (Mukhriani 2014; Tiwari *et al.* 2011). Rendemen hasil fraksinasi fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dapat dilihat pada tabel 5 dibawah ini.

**Tabel 5. Rendemen hasil fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak daun belimbing wuluh**

| Bobot ekstrak (g) | Fraksi           | Bobot fraksi (g) | Prosentase % ( <sup>b</sup> / <sub>b</sub> ) |
|-------------------|------------------|------------------|--|
| 20                | <i>n</i> -heksan | 1,58             | 3,95   |
| 20                | Etil asetat      | 2,81             | 14,05  |
| 20                | Air              | 6,93             | 34,65  |

Berdasarkan tabel 5 dapat dilihat bahwa perhitungan prosentase rendemen fraksinasi fraksi *n*-heksan daun belimbing wuluh diperoleh prosentasenya yaitu 3,95%. Fraksinasi fraksi etil asetat daun belimbing wuluh diperoleh prosentasenya yaitu 14,05% dan fraksinasi fraksi air daun belimbing wuluh diperoleh prosentasenya yaitu 34,65%. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak daun belimbing wuluh dapat dilihat pada lampiran 16.

Hasil fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibandingkan fraksi yang lain karena sebagian besar senyawa dalam daun belimbing wuluh bersifat polar. Rendemen setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menarik senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun belimbing wuluh berbeda. Hasil rendemen yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu 100% atau mendekati 100%. Hal tersebut kemungkinan disebabkan ekstrak banyak yang menempel pada wadah dan corong pisah dan kurangnya kekentalan ekstrak untuk proses fraksinasi.

## 7. Hasil identifikasi kandungan kimia daun belimbing wuluh

Identifikasi kandungan kimia daun belimbing wuluh dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terkandung di dalam senyawa serbuk, ekstrak dan fraksinasi pada daun belimbing wuluh. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 6.

**Tabel 6. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun belimbing wuluh**

| Senyawa   | Hasil                     |                                     | Pustaka  | Keterangan |         |
|-----------|---------------------------|-------------------------------------|--|------------|---------|
|           | Serbuk                    | Ekstrak                             |  | Serbuk     | Ekstrak |
| Flavonoid | Warna kuning              | Warna kuning                        | Reaksi positif ditandai dengan kuning pada larutan (Puspasari <i>et al.</i> 2014).                 | (+)        | (+)     |
| Saponin   | Busa stabil               | Busa stabil                         | Terbentuk busa yang stabil + 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang (Setyowati <i>et al.</i> 2014).      | (+)        | (+)     |
| Tanin     | Warna hitam               | Warna hitam                         | Terbentuk warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Setyowati <i>et al.</i> 2014). | (+)        | (+)     |
| Alkaloid  | Mayer: warna jingga       | Mayer: warna coklat muda            | Mayer: terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan   | (-)        | (-)     |
|           | Dragendroff: warna jingga | Dragendroff: warna hijau kekuningan | Dragendroff: terbentuk endapan merah sampai jingga (Alamsyah 2014)                                 | (-)        | (-)     |

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

Identifikasi kandungan kimia terhadap serbuk dan ekstrak daun belimbing wuluh berdasarkan tabel 6 yang telah dilakukan menunjukkan bahwa serbuk daun belimbing wuluh mengandung senyawa kimia flavonoid, saponin dan tanin. Dan pada ekstrak daun belimbing wuluh menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa kimia flavonoid, saponin dan tanin. Pada ekstrak dan fraksinasi daun belimbing wuluh tidak terdapat kandungan senyawa alkaloid. Hasil identifikasi golongan senyawa pada serbuk dan ekstrak daun belimbing wuluh dapat dilihat pada lampiran 6.

Hasil identifikasi kandungan kimia fraksinasi dari ekstrak daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 7 dibawah ini.

**Tabel 7. Identifikasi kandungan kimia fraksinasi dari ekstrak daun belimbing wuluh**

| Senyawa   | Hasil                              |                               |                                     | Keterangan       |             |     |
|-----------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|------------------|-------------|-----|
|           | <i>n</i> -Heksan                   | Etil asetat                   | Air                                 | <i>n</i> -Heksan | Etil asetat | Air |
| Flavonoid | Warna hijau                        | Warna kuning                  | Warna coklat muda                   | (-)              | (+)         | (-) |
| Alkaloid  | Mayer: warna coklat hijau tua      | Mayer: warna hijau kekuningan | Mayer: warna coklat kemerahan       | (-)              | (-)         | (-) |
|           | Dragendroff: warna hijau kehitaman | Dragendroff: warna hijau tua  | Dragendroff: warna hijau kecoklatan | (-)              | (-)         | (-) |
| Saponin   | Busa stabil                        | Busa stabil                   | Busa stabil                         | (+)              | (+)         | (+) |
| Tanin     | Warna hitam                        | Warna coklat kehitaman        | Warna hitam                         | (+)              | (+)         | (+) |

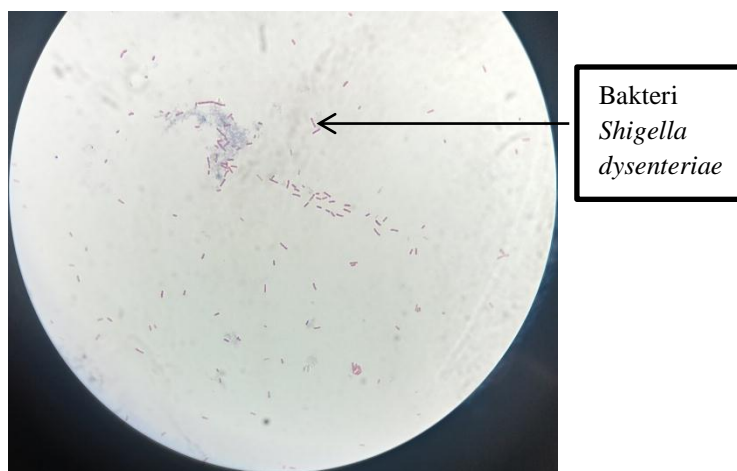
Keterangan : (+) : mengandung golongan senyawa

(-) : tidak mengandung golongan senyawa

Berdasarkan tabel 7 yang telah dilakukan menunjukkan bahwa, hasil identifikasi fraksi *n*-heksan dari ekstrak daun belimbing wuluh mengandung senyawa kimia saponin dan tanin. Hasil identifikasi fraksi etil asetat dari ekstrak daun belimbing wuluh mengandung senyawa flavonoid, saponin dan tanin. Dan hasil identifikasi pada fraksi air dari ekstrak daun belimbing wuluh mengandung senyawa saponin dan tanin. Senyawa flavonoid, saponin dan tanin telah diketahui dapat digunakan sebagai antibakteri dengan mekanisme antibakteri yang berbeda pada setiap senyawa. Berdasarkan kandungan kimia yang dimiliki dapat diketahui dan dipastikan bahwa daun belimbing wuluh dapat digunakan sebagai antibakteri. Hasil identifikasi golongan senyawa pada fraksinasi dari ekstrak daun belimbing wuluh dapat dilihat pada lampiran 7.

## 8. Hasil identifikasi bakteri uji *Shigella dysenteriae*

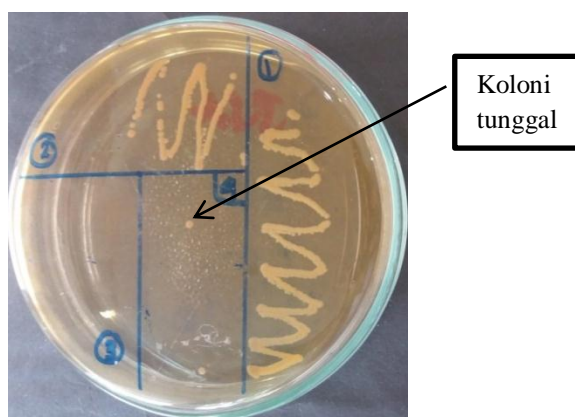
**8.1. Hasil identifikasi bakteri secara pewarnaan Gram.** Bakteri *Shigella dysenteriae* setelah dilakukan pewarnaan Gram, dilakukan dengan pengamatan dibawah mikroskop diperoleh hasil merupakan Gram negatif dengan berwarna merah dan berbentuk batang atau basil. Hasil identifikasi pewarnaan Gram bakteri *Shigella dysenteriae* dapat dilihat pada gambar 5.



**Gambar 5.** Hasil identifikasi mikroskopis terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* dengan pewarnaan Gram

**8.2. Hasil identifikasi bakteri secara goresan.** Identifikasi bakteri uji *Shigella dysenteriae* dilakukan dengan cara biakan *Shigella dysenteriae* diinokulasi pada media selektif *Salmonella Shigella Agar (SSA)* dan diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Penampakan koloni yang terjadi yaitu kecil, halus, tidak berwarna, tepi dan permukaan rata.

Hasil pengujian ditunjukkan dengan penampakan koloni bulat, halus tepi dan permukaan rata. Hasil identifikasi bakteri *Shigella dysenteriae* secara inokulasi dapat dilihat pada gambar 6.



**Gambar 6.** Hasil identifikasi bakteri *Shigella dysenteriae* secara goresan pada media *Salmonella Shigella Agar (SSA)*

**8.3. Hasil identifikasi bakteri uji secara biokimia.** Hasil identifikasi bakteri uji *Shigella dysenteriae* secara biokimia dapat dilihat pada tabel 8 dan gambar 7.



Tabel 8. Hasil identifikasi biokimia pada *Shigella dysenteriae*

| Pengujian | Hasil      | Pustaka (Bonang dan Koeswardono, 1982) |
|-----------|------------|--|
| KIA       | K / A S(-) | K / A S(-)                             |
| SIM       | - - -      | - /+ -                                 |
| LIA       | K / A S(-) | K / A S(-)                             |
| Citrat    | -          | -                                      |

Keterangan :

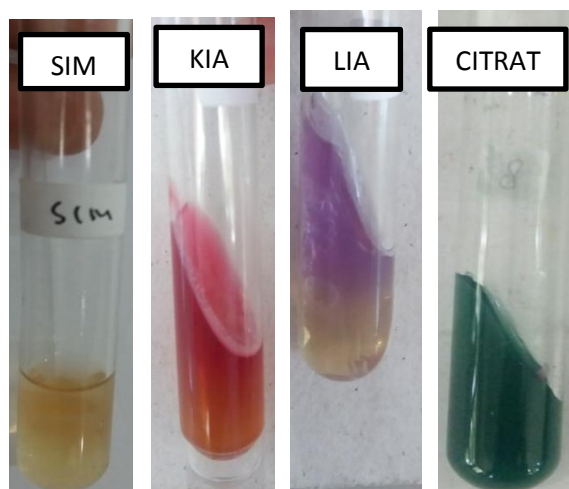
SIM : *Sulfida Indol Agar*KIA : *Kliger Iron Agar*LIA : *Lysine Iron Agar*

K : merah (pada media KIA)

A : terbentuk warna kuning

K : terbentuk warna ungu (pada media LIA)

S(-) : tidak terbentuk warna hitam

Gambar 7. Hasil identifikasi bakteri uji *Shigella dysenteriae* secara biokimia menggunakan media SIM, KIA, LIA dan CITRAT

Pengujian *Shigella dysenteriae* pada media SIM menunjukkan (- - -) yaitu *Shigella dysenteriae* tidak dapat mereduksi thiosulfate sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide sehingga tidak berwarna hitam, indol negatif karena *Shigella dysenteriae* tidak menghasilkan enzim tryphanase yang mengubah tryptophan menjadi indol ditambah asam piruvat dan  $\text{NH}_3$ . Motilitas negatif yang berarti tidak ada pergerakan bakteri karena pertumbuhan bakteri hanya dibekas tusukan.

Pengujian pada media KIA memberikan hasil bagian lereng berwarna merah (K) karena adanya proses oksidasi dekarboksilasi protein membentuk amina yang bersifat alkali dengan adanya *fenol red*. Bagian dasar berwarna kuning (A), karena *Shigella dysenteriae* memfermentasi karbohidrat yaitu menguraikan glukosa dan tidak menguraikan laktosa. Sulfida negatif dengan tidak

adanya warna hitam pada media yang dikarenakan tidak memproduksi hidrogen sulfida.

Pengujian pada LIA diperoleh hasil bagian lereng berwarna ungu karena bakteri *Shigella dysenteriae* mendekarboksilasi lisin sehingga menyebabkan reaksi basa, dasar berwarna kuning karena bakteri mendeaminasi lisin dan tidak membentuk warna hitam S (-) karena tidak memproduksi hidrogen sulfida.

Pengujian pada media CITRAT diperoleh hasil negatif berwarna hijau, yang berarti *Shigella dysenteriae* tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal.

## **9. Hasil pengujian antibakteri secara difusi**

Tujuan uji difusi adalah untuk mengetahui daya hambat ekstrak dan fraksinasi daun belimbing wuluh terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*. Hasil dari ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak daun belimbing wuluh dilakukan pengujian antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* untuk mengetahui fraksi yang paling aktif.

Pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi ekstrak daun belimbing wuluh dilakukan terhadap *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi larutan masing-masing 50%, 25% dan 12,5% pembanding dengan menggunakan kontrol positif (+) kotrimoksazol konsentrasi 25 µg sedangkan pembanding dengan menggunakan kontrol negatif (-) DMSO 5%. Perhitungan konsentrasi larutan dapat dilihat pada lampiran 10. Pembuatan suspensi bakteri disesuaikan dengan menggunakan larutan standar Mc.Farland 0,5. Masa inkubasi pengujian selama 24 jam pada suhu 37°C, ada tidaknya daya hambat yang teramati dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram (*disk*) menandai bahwa kandungan kimia ekstrak etanol 70% dan fraksinasi dari ekstrak daun belimbing wuluh memiliki daya hambat terhadap bakteri uji.

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak daun belimbing wuluh dengan menggunakan pelarut etanol 70% terhadap *Shigella dysenteriae* menunjukkan daya hambat, ini membuktikan dengan adanya daerah yang jernih di sekitar cakram (*disk*) yang tidak ditumbuhi bakteri. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi pada tabel 9.

**Tabel 9. Diameter hambat pada uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat, air, dan ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri *Shigella dysenteriae***

| Sediaan uji                        | Konsentrasi<br>(% <sup>b</sup> ) <sub>v</sub> | Diameter zona hambat |      |      | Rata-rata ±SD |
|------------------------------------|---|----------------------|------|------|---------------|
|                                    |   | Replikasi            |      |      |               |
|                                    |   | I                    | II   | III  |               |
| Ekstrak                            | 50%   | 8,5                  | 8,9  | 8,3  | 8,56±0,305    |
|                                    | 25%   | 8,1                  | 8    | 7,9  | 8,0±0,1       |
|                                    | 12,5%   | 7,7                  | 7,5  | 7,7  | 7,63±0,115    |
| Fraksi n-heksan                    | 50%   | 7,2                  | 7    | 7,1  | 7,1±0,1       |
|                                    | 25%   | 6,9                  | 7,1  | 6,8  | 6,93±0,152    |
|                                    | 12,5%   | 6,9                  | 6,7  | 6,4  | 6,55±0,251    |
| Fraksi Etil asetat                 | 50%   | 12                   | 12,5 | 12,8 | 12,43±0,404   |
|                                    | 25%   | 11,9                 | 12   | 12,2 | 12,03±0,624   |
|                                    | 12,5%   | 12,1                 | 11,9 | 11,5 | 11,83±0,305   |
| Fraksi Air                         | 50%   | 6,1                  | 6    | 6,3  | 7,03±0,152    |
|                                    | 25%   | 6,4                  | 6,2  | 5,9  | 6,16±0,251    |
|                                    | 12,5%   | 6,0                  | 5,8  | 6,1  | 5,9±0,152     |
| Kontrol positif<br>(Kotrimoksazol) | 25µg  | 22,6                 | 22,9 | 22,8 | 22,7±0,152    |
| Kontrol negatif<br>(DMSO)          | 5%  | 0                    | 0    | 0    | 0±0           |

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh, fraksi n-heksan, etil asetat dan air terhadap *Shigella dysenteriae* menunjukkan adanya daya hambat, ini dilakukan dengan adanya daerah jernih disekitar cakram (*disk*) yang tidak ditumbuhi bakteri. Kemudian dari tabel 9 dapat dilihat bahwa diameter hambat yang paling besar adalah fraksi etil asetat pada konsentrasi 50% dengan diameter rata-rata 12,43 mm, sedangkan diameter hambat yang terkecil adalah fraksi air pada konsentrasi 12,5% dengan diameter rata-rata 5,9 mm. Dan dari hal tersebut dapat diketahui bahwa dengan meningkatnya konsentrasi fraksi akan memberikan ukuran zona hambat yang semakin besar, sehingga kemampuan aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* semakin baik.

Pada hasil diameter hambat yang diperoleh pada fraksi teraktif yaitu etil asetat pada konsentrasi 50% dengan diameter rata-rata 12,43 mm yaitu termasuk kategori kuat. Besarnya zona hambat, kekuatan antibakteri dibagi menjadi 4 kelompok yaitu bila zona hambat > 20 mm berarti sangat kuat, zona hambat berukuran 10-20 mm termasuk kuat, untuk kategori sedang berukuran 5-10 mm dan yang lemah zona hambat < 5 mm (Arista, 2013).

Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* disebabkan karena adanya metabolit sekunder yang dihasilkan yang terdapat pada daun belimbing wuluh seperti flavonoid, saponin dan tanin. Senyawa kimia tersebut memiliki aktivitas antibakteri. Flavonoid merupakan senyawa aktif yang berfungsi untuk mengganggu sintesis dinding sel bakteri sehingga menyebabkan kebocoran plasma yang mengakibatkan lisisnya bakteri (Chusnie, 2005). Saponin merupakan senyawa yang bersifat antibakteri dengan merusak membran sel bakteri. Membran sel bakteri berfungsi sebagai jalan keluar masuknya bahan-bahan penting yang dibutuhkan bakteri. Apabila membran sel mengalami kerusakan akan mengakibatkan sel bakteri tersebut mati (Ajizah, 2004). Tanin mempunyai sifat antibakteri dengan merusak membran sitoplasma sehingga bakteri akan mati. Tanin juga memiliki kemampuan dalam menginaktivasi adhesin sel mikroba (molekul yang menempel pada sel inang) karena tanin merupakan senyawa fenol (Cowan, 1999). Untuk memastikan fraksi etil asetat teraktif dilanjutkan ke uji analisa data. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 11.

Kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui apakah pelarut memiliki potensi menghambat atau membunuh bakteri. Kontrol negatif yang digunakan adalah pelarut DMSO 5% yang tidak memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri uji karena tidak terbentuk zona hambat disekitar cakram maka zona hambat atau zona bunuh yang terbentuk tidak ada pengaruh dari pelarut. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah kotrimoksazol. Antibiotik kotrimoksazol dipilih untuk pengujian daya antibakteri karena efek sinergis dari trimethoprim dan sulfametoksazol menghambat reaksi enzimatik obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi ini merupakan kemajuan penting dalam usaha meningkatkan efektivitas klinik antimikroba.

Analisa data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi secara statistik Analisis of Varian (ANOVA) *one way*. ANOVA *one way* digunakan untuk membandingkan sampel tiap konsentrasi. Data yang dianalisis dengan etil asetat, air, dan ekstrak etanol daun belimbing wuluh. Kontrol positif

dan kontrol negatif diikuti sertakan dalam analisis ANOVA *one way*. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara fraksi *n*-heksan, etil asetat, air, ekstrak etanol, kontrol positif dan kontrol negatif guna mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji *One-Sample Kolmogorove-Sminov* diperoleh signifikan  $0,51 > 0,05$  maka  $H_0$  diterima, data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji ANOVA. Hasil uji *oneway* ANOVA tabel diameter hambat diperoleh  $F = 1754,680$  dengan probabilitas  $0,000 < 0,05$  yang berarti dari tiap sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *Shigella dysenteriae*. Berdasarkan tabel Turkey dan Bonferroni test terdapat tanda \* pada *Mean Difference*, tanda tersebut menunjukkan bahwa perbedaan diameter hambat aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Apabila tidak terdapat tanda \* maka diameter hambat aktivitas antibakteri tidak signifikan yang berarti tidak memiliki perbedaan. Hasil analisis Turkey test dan Boniferroni test dapat dilihat pada lampiran 23.

Tabel *Homogeneous Subsets* bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* terbagi dalam 9 subset semakin arah kekanan semakin besar diameter hambatnya. Subset 9 terdapat kotrimoksazol. Subset 8 terdapat fraksi etil asetat 50%, 25% dan 12,5%. Subset 7 terdapat ekstrak 50% dan 25%. Subset 6 terdapat ekstrak 25% dan 12,5%. Subset 5 terdapat ekstrak 12,5%, fraksi *n*-heksan 50%. Subset 4 terdapat fraksi *n*-heksan 50%, 25%, 12,5%. Subset 3 terdapat fraksi *n*-heksan 12,5%, fraksi air 25%, 50%. Subset 2 terdapat fraksi air 25%, dan 12,5%. Subset 1 terdapat kontrol DMSO 5%. Diameter hambat diketahui dari subset 1-9 mempunyai beda nyata dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Berbeda dengan sampel termasuk dalam satu subset tidak mempunyai beda secara signifikan dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Fraksi teraktif adalah etil asetat meskipun tidak dalam satu subset dengan kotrimoksazol (kontrol positif). Tabel *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada lampiran 23.

## 10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif yaitu fraksi etil asetat dilakukan dengan menggunakan metode dilusi untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan membuat konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,09%, kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-).

Aktivitas antibakteri dapat diketahui dari kekeruhan masing-masing tabung uji yang kemudian digoreskan dalam media *Salmonella Shigella Agar* (SSA). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat ditentukan dari konsentrasi terendah larutan uji yang terlihat jernih, akan tetapi hal ini sulit diamati karena berwarna gelap dan kekeruhannya tinggi. Karena hal tersebut maka KHM tidak dapat ditentukan sehingga untuk menentukan KBM masing-masing tabung larutan uji dilakukan penggoresan pada media SSA, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian secara dilusi dapat dilihat pada tabel 10 dan lampiran 12.

**Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari ekstrak daun belimbing wuluh terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* secara dilusi**

| Konsentrasi % <sup>b</sup> / <sub>v</sub> | Fraksi Etil Asetat |    |     |
|---|--------------------|----|-----|
|   | Replikasi          |    |     |
|   | 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

(+) : adanya pertumbuhan bakteri

K (-) : kontrol negatif berisi fraksi etil asetat

K (+) : kontrol positif berisi suspensi bakteri *Shigella dysenteriae*

Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif yaitu fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap *Shigella dysenteriae* seperti pada tabel 10 menunjukkan bahwa dari uji dilusi yang dilakukan didapat bahwa

Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 12,5%. KBM yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan cara menginokulasi sediaan dari tabung uji pada media SSA dalam cawan petri. KBM ditentukan dengan Konsentrasi Bunuh Minimum yang tidak menunjukkan pertumbuhan *Shigella dysenteriae* pada media SSA. Replikasi I, II dan III dari fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 50%; 25%; diperoleh hasil tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Hasil KBM yang diperoleh dari fraksi etil asetat yang dapat menghambat bakteri pada konsentrasi 12,5% pada replikasi I dan III karena tidak terdapat pertumbuhan bakteri, sedangkan pada replikasi II terdapat pertumbuhan bakteri dapat disebabkan pada waktu pengerjaan kurang aseptis dan pemanasan pada jarum Ose tidak sampai membara.

Semakin tinggi konsentrasi sediaan uji maka semakin tinggi pula kandungan zat aktif di dalamnya, sehingga aktivitas antibakteri akan semakin besar dan juga sebaliknya semakin rendah konsentrasi sediaan uji maka semakin sedikit kandungan zat aktif di dalamnya sehingga aktivitas antibakteri akan semakin berkurang. Sediaan uji yang memiliki Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) semakin kecil, menandakan semakin potensialnya sediaan tersebut sebagai antibakteri karena dengan konsentrasi kecil sediaan uji dapat membunuh bakteri.

Fraksi etil asetat yang paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* karena adanya kandungan senyawa flavonoid, saponin dan tanin yang terdapat dalam fraksi etil asetat. Senyawa tersebut mampu menghambat aktivitas mikroba melalui mekanisme kerja yang berbeda. Senyawa flavonoid memiliki mekanisme kerja dengan mendenaturasi protein sel dan merusak membran sel mikroorganisme. Substansi yang dapat mendenaturasi protein dan merusak sel tanda dapat diperbaiki sehingga pertumbuhan mikroba terhambat (Gunawan & Mulyani 2004).

Saponin merupakan glukosida yang larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter. Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteri lisis, jadi mekanisme kerja saponin termasuk dalam kelompok antibakteri yang

mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida (Gusti, 2014).

Senyawa tanin merupakan senyawa turunan fenol yang secara umum mekanisme antimikrobanya dari senyawa fenol. Tanin merupakan growth inhibitor, sehingga banyak mikroorganisme yang dapat dihambat pertumbuhannya oleh tanin. Tanin mempunyai target pada polipeptida dinding sel. Senyawa ini merupakan zat kimia yang terdapat dalam tanaman yang memiliki kemampuan menghambat sintesis dinding sel bakteri dan sintesis protein sel kuman Gram positif maupun Gram negatif. Aktivitas tanin sebagai antimikroba dapat terjadi melalui beberapa mekanisme yaitu menghambat enzim antimikroba dan menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara bereaksi dengan membran sel dan menginaktivasi enzim-enzim esensial atau materi genetik (Gusti, 2014).



## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) pada konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*.

Kedua, fraksi etil asetat dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) adalah fraksi yang mempunyai aktivitas antibakteri paling efektif terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* yaitu pada konsentrasi 50% dengan diameter zona hambat kuat sebesar 12,43 mm.

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat dari ekstrak daun belimbing wuluh terhadap *Shigella dysenteriae* yaitu pada konsentrasi 12,5%.

#### **B. Saran**

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melakukan uji aktivitas antibakteri daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap mikroorganisme lainnya.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap *Shigella dysenteriae*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdurahman D. 2008. *Biologi Kelompok Pertanian dan Kesehatan*. Bandung : Grafindo Media Pratama. Hlm. 63.
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella Typhymurium* terhadap ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guava* L.), *Bioscientiae*, 1(1).
- Akhyar. 2010. uji daya hambat dan analisis klt bioautografi ekstrak akar dan buah bakau (*rhizopora stylosa griff.*) terhadap vibrio harveyii [Skripsi]. Makasar: Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi, Universitas Hasanudin Makasar.
- Alamendah. 2010. Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) *Kaya Khasiat*. Alamendah.wordpress.com/2010/08/15/belimbing-wuluh-Averrhoa-bilimbi-kaya-khasiat/. 29 Desember 2010.
- Anonymous, 2007, *Vegetation: Belimbing Wuluh*, (Online), (<http://blog.360.yahoo.com/blog-jlVAipcyqhja6.QsE5bEBdhcQ--?cq=1&p=190>, diakses 17 Mei 2007).
- Arista, Y.N. 2013. Formulasi dan uji aktivitas gel antijerawat ekstrak umbi bakung (*Crinum Asiaticum* L.) terhadap bakteri Staphylococcus aureus secara in vitro, (<http://ejournal.unstrat.ac.id/index.php/pharmacon/article/view/1552>)
- Bela, B., 2011, Microbial and Susceptibility Pattern of Gram Negative Infection: Infection Diseases New Challenges New Solutions, Proceeding 12th Jakarta Antimicrobial Update (JADE) 2011, Jakarta.
- Bonang dan Koeswardono, 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*, Gramedia. Jakarta.
- Darsana I.G.O Besung I.N.K, Mahatmi H. 2012. Potensi Daun Binahong (*Anredera Cordifolia (Tonore) Steenis*) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli* Secara In Vitro. *Indonesia Medicus Veterinus* 1:337-351.
- Dalimarta S. 2008. *1001 Resep Herbal*. Jakarta: Penebar Swadaya. Hlm 11-12
- Depkes RI. 2000. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (I) Jilid 1*. Jakarta RI. Hlm 177-178.
- Didik Gunawan, Sri Mulyani. 2004. Obat hayati golongan minyak atsiri. Dalam: Ilmu Obat Alam (*Farmakognosi*). Cetakan I. Jakarta: Penebar Swadaya. Hal.119-120.

- Chusnie, T.P.T 2005. Lamb, AJ., Antimicrobial activity of flavonoids. *Internasional Journal of Antimicrobial Agent*. Vol.26, 343-356.
- Cowan, M.M. 1999. Plant Product as Antimicrobial Agent. *Clinical Microbiology Review*. 12(4),564-582.
- Gunawan SG, setiabuy R, Nafrialdi, Elysabeth, editor. 2009. *Farmakologi dan Terapi*. Ed ke 5. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUL hlm 585-587, 605-608.
- Gusti I Ayu Istri Praminingrat Aryadi. 2014. Pengaruh Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Sebagai Penyebab Abses Periodontal Secara In Vitro. Skripsi Jurusan Kedokteran Gigi. Universitas Mahasaraswati Denpasar. Denpasar.
- Faharani BGR. 2009. Uji aktivitas antibakteri daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara in vitro.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. 2007. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Ed ke-12. USA: MOSBY ELSEVEIR. Hlm 45-46.
- Harborne J, B. 2007. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. 4<sup>th</sup>. Alih Bahasa: K. Padmawinata. Bandung: ITB Press.
- Hayati EK, Jannah A dan Fasya AG. 2009. Aktivitas Antibakteri Komponen Tanin Ekstrak Daun Blimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) Sebagai Pengawet Alami. Laporan Penelitian Kuantitatif Depag 2009. Jakarta: Depag
- Indraswari, A. 2008. *Optimasi Pembuatan Ekstrak Daun Dewan Daru (Eugenia Uniflora L.) Menggunakan Metode Maserasi dengan Parameter Kadar Total Senyawa Fenolik dan Flanonoid*. Surakarta: Tugas Akhir Teknik Kimia Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Inyu. 2006. Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*). <http://inyu.mutiply.com/journal/item/3.23Agustus2008>.
- Istiqomah. 2013. *Perbandingan Metode Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (Piperis retrofracti fructus)* Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Jakarta: Universitas Islam negeri Syarif Hidayatullah. Halaman 11-14,21.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2010. *Medical Microbiology*. Ed ke-25. New York: McGraw Hill Medical. Hlm 238, 351-354, 357.

- Jawetz E, JL Melnick EA Adelberg. 2012. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*, diterjemahkan oleh Bonang G. Edisi XXIV. ECG. Penerbit: Universitas Indonesia, Jakarta. Terjemahan dari: *Medical Microbiologi*. 26<sup>th</sup> Ed.
- 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.
- Khalili M. 2014. *Acute bacterial dysentery in children*. Zahedan University of Medical Sciences. Iran. *Int J Infect* 1(3).
- Khoirani, Nur., 2013. Karakteristik Simplisia Dan Standarisasi Ekstrak Etanol Herba Kemangi (*Ocimum americanum* L.). Skripsi. Program Studi Farmasi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah; Jakarta.
- Leboffe MJ, Pierce BE. 2011. *A Photographic Atlas For The Microbiology Laboratory*, Ed ke-4. USA: Morton Publishing Company. Hlm 2-6, 13, 64, 80-81, 94-96, 127-128, 156-157.
- Liantari, D. S. 2014. Effect Of Wuluh Starfruit Leaf Extract For *Streptococcus mutans* Growth . 3.
- Maryuni, Agnes Eri. 2008. *Isolasi dan Identifikasi Antibakteri Minyak Atsiri Daun Zodia (Evodia sp.)*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Mukhlisoh W. Pengaruh Ekstrak Tunggal dan Gabungan Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn) terhadap Efektivitas Antibakteri secara In Vitro. [Skripsi]. Malang (Indonesia):Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim; 2010.
- Nugrahawati, D., TenNur, R., & Hana , W. 2009. Pemanfaatan Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) sebagai Cairan Akumulator Secara Alami dan Ramah Lingkungan. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Oliphant, C. M., Green, G. M., 2002, Quinolones: A Comprehensive Review. *Am. Fam. Physician*. 65: 455-464
- Pendit, P.A.C.D., Zubaidah, E., Sriherfyna, F.H., 2016, Karakteristik Fisik-Kimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, Vol. 4 No,1 400-409.
- Permatawati HT. 2015. Uji aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari kulit buah kaitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.

- Putri WS., Warditiani NK., Larasanty LPF. 2013. Skrining fitokimia ekstrak etil asetat kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) [Skripsi]. Bali: Universitas Udayana. Hlm 56-60
- Puspasari R.K.FM, *et al.* 2014. *Studi Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Daun Sukun (Artocarpus Altilis) Terhadap pertumbuhan Bakteri Pseudomonas aeruginosa* Jurnal: Sains dan Teknologi Kimia, Jilid 5 No. 2.
- Prastowo, Eko Andri. 2013. *Standarisasi Simplisia*. Surabaya : Universitas Airlangga
- Prayudhani *et al.* 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Sawo Kercik (*Manilkara kauki* I. Dubard) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal SMK Negeri 1 Pasuruan dan Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang*.
- Radji, M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*, Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran EGD.
- Raihana, Nadia. 2011. *Profil Kultur Dan Uji Sensitivitas Bakteri Aerob Dan Infeksi Luka Operasi Laparotomi Di Bangsal Bedah RSUP DR. M. Djamil Padang*. [Artikel]. Padang: Universitas Andalas.
- Rinawati ND. 2011. Daya antibakteri tumbuhan majapahit (*Crescentia cujete* L.) terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* [Tugas Akhir]. Surabaya: Program Studi Biologi. ITS.
- Riong S. Panjaitan, Lilih R. Kadiwijati, Dimas Seto, Hengky. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa blimbi* L.) Terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae*. *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal*. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas 17 Agustus 1945.
- Sari DRAP, Yustiantara PS, Paramita NLPV, Wirasuta IMAG. 2011. Uji aktivitas antibakteri ekstral etanol buah lada hitam (*Piper nigrum* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* [Skripsi]. Bali: Fakultas Farmasi, Udayana.
- Setianingrum TR. 2010. Isolasi fungi endofit penghasil antimikroba dari *Terminalia catappa* L., dan identifikasi senyawa aktifnya menggunakan bioautografi [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada.
- Shanmugam JT. 2006. Efek Lavarsida Ekstrak Jus Asam Jawa (*Tamarindus Indica*) Terhadap Larva Instar III *Aedes aegypti* di laboratorium. [Skripsi]

- Sudarsono D, Gunawan S, Wahyuono, Donatus, Purnama. 2002. *Tumbuhan Obat II: Hasil Penelitian, Sifat-Sifat, Penggunaan.Cet I*. Yogyakarta: Pusat Studi Obat Tradisional Yogyakarta.
- Sunarya, Yayan, Agus Setiabudi. 2007. *Mudah dan Aktif Belajar Kimia*. Jakarta: PT.Setia Purna Inves.
- Sriyanti DP, Wijayanti A. 2008. *Teknik Kultur Jaringan*. Cetakan ke-9. Yogyakarta : Penerbit Kanisius. Hlm. 86.
- Tiwari P, Bimleshk, Mandeep K, Gurpreet K, Harleen K. 2011. Skrinning Fitokimia dan Ekstraksi. *Internationale Pharmaceutica Science* 1:113-116.
- Thomas, A.N.S., 2007, *Tanaman Obat Tradisional 2*, Kanisius, Yogyakarta, hal 17-18.
- Ummah, MK. 2010. Ekstraksi dan Pengujian Aktivitas Antibakteri Senyawa Tanin pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) (Kajian Variasi Pelarut). Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang
- World Health Organization (WHO), 2005, *Guidelines For The Control Of Shigellosis, Including Epidemics Due To Shigella dysenteriae type I*, WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland, p. 12-15.
- 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* 2:1-16
- Yahya, D.R., Posmaningsih, D.A.A., dan Notes, N. 2014. Pengaruh Penambahan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Pada Perebusan Telur Asin Terhadap Nilai Angka Kuman Dan Uji Organoleptik, *Jurnal Kesehatan Lingkungan* Vol.4 No.2, Novemver 2014, 162-168.

*L*

*A*

*M*

*P*

*I*

*R*

*A*

*N*

## Lampiran 1. Hasil Determinasi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS SEBELAS MARET  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
**LAB. PROGRAM STUDI BIOLOGI**

Jl. Ir. Sutami 36A Ketingan Surakarta 57126 Telp. (0271) 663375 Fax (0271) 663375  
http://www.biology.mipa.uns.ac.id, E-mail biologi@mipa.uns.ac.id

Nomor : 63/UN27.9.6.4/Lab/2018  
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan  
Lampiran : -

Nama Pemesan : Gracesya Indah Dayani  
NIM : 20144233A  
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

### HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Averrhoa bilimbi* L.  
Familia : Oxalidaceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963) :  
1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-  
33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-  
74a-75b-76a-77a-78b-103c-104b-106b-107a-108b-109a-110a-111b-112a-113a 53. Oxalidaceae  
1a 3. Averrhoa  
1b Averrhoa bilimbi L.

#### Deskripsi Tumbuhan :

Habitus : pohon, menahun, tumbuh tegak, tinggi 5-15 m. Akar : tunggang, bercabang, putih kotor atau putih kekuningan. Batang : bentuk bulat, berkayu, permukaan batang kasar berbenjol-benjol; percabangan sedikit, arahnya condong ke atas, cabang muda berambut halus seperti beludru, warnanya cokelat muda. Daun : tersusun spiral, meninggalkan bekas daun berbentuk jantung atau ginjal pada batang atau cabang, daun majemuk menyirip ganjil dengan 21-45 pasang anak daun; anak daun bertangkai pendek, bentuk bulat telur sampai jorong atau memanjang, panjang 2-10 cm, lebar 1.5-3 cm, ujung runcing, pangkal membundar, tepi rata, permukaan atas hijau tua, permukaan bawah hijau muda dan berbulu halus. Bunga : bunga majemuk berupa malai menggantung, berkelompok, keluar dari batang atau percabangan yang besar, panjang perbungaan 5-20 cm, bunga kecil-kecil berbentuk bintang; kelopak bunga 5-7 mm, hijau; daun mahkota bunga bentuk lanset atau spatel, hampir bergandengan atau tidak, panjang 13-20 mm, ungu gelap sampai ungu kemerahan tapi lebih pucat pada bagian pangkalnya; benangsari 10, semuanya fertil, yang berhadapan dengan daun mahkota bunga akan menjadi staminodia (steril), panjang 3-4 cm; putik dengan tangkai putik yang sama panjangnya (*homostylus*). Buah : buah buni, bentuknya bulat lonjong bersegi, panjang 4-6.5 cm, beruang 5, tiap ruangan berisi 2-3 biji, warnanya hijau kekuningan, bila masak berair banyak, rasanya asam. Biji : bentuknya bulat telur, gepeng, panjang 6-7 mm.

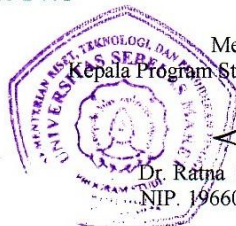
Surakarta, 26 Maret 2018

Kepala Lab. Program Studi Biologi

Dr. Tetri Widiyani, M.Si.  
NIP. 19711224 200003 2 001

Penanggungjawab  
Determinasi Tumbuhan

Suratman, S.Si., M.Si.  
NIP. 19800705 200212 1 002



Mengetahui  
Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS

Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si.  
NIP. 19660714 199903 2 001



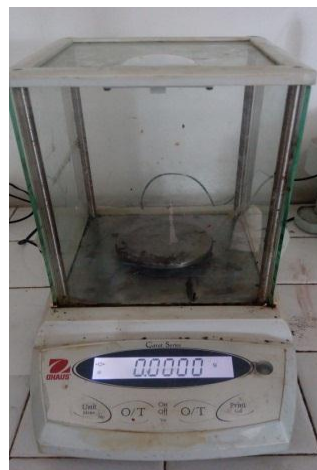
**Lampiran 2. Gambar daun dan serbuk belimbing wuluh**



**Daun belimbing wuluh**



**Serbuk daun belimbing wuluh**

**Lampiran 3. Gambar alat penelitian****Alat penggilingan****Alat Moisture Balance****Timbangan****Timbangan elektrik**



**Oven**



**Evaporator**



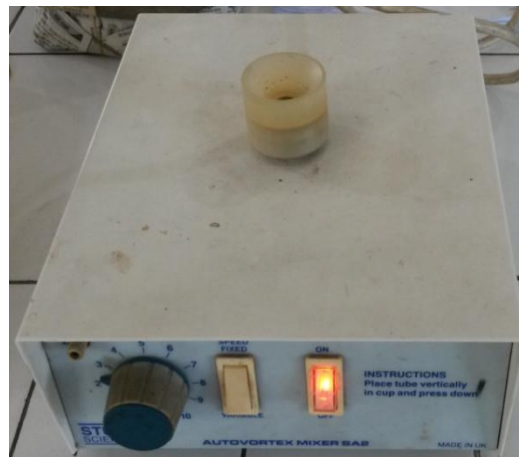
**Waterbath**



**Botol maserasi**



**Vortex**

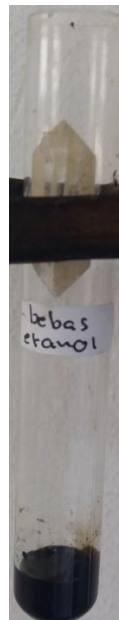


**Incubator**

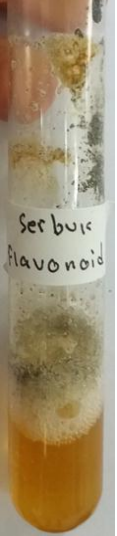



**Lampiran 4. Hasil fraksinasi dari ekstrak daun belimbing wuluh**




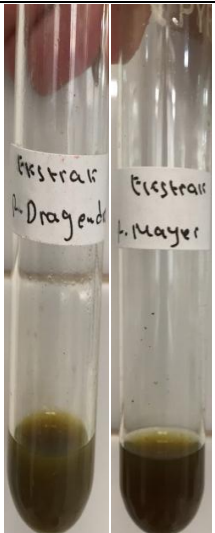


**Lampiran 5. Hasil uji bebas etanol ekstrak kental daun belimbing wuluh**





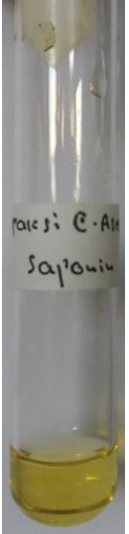





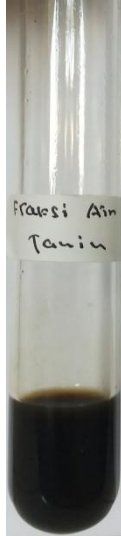



**Lampiran 6. Hasil Identifikasi kimia serbuk dan ekstrak daun belimbing wuluh**

| Kandungan Kimia | Gambar Identifikasi  |  |
|-----------------|--|--|
|                 | Serbuk   | Ekstrak  |
| Flavonoid       |   |   |
| Saponin         |  |  |

|                 |  |  |
|-----------------|--|--|
| <b>Tanin</b>    |   |   |
| <b>Alkaloid</b> |  |  |

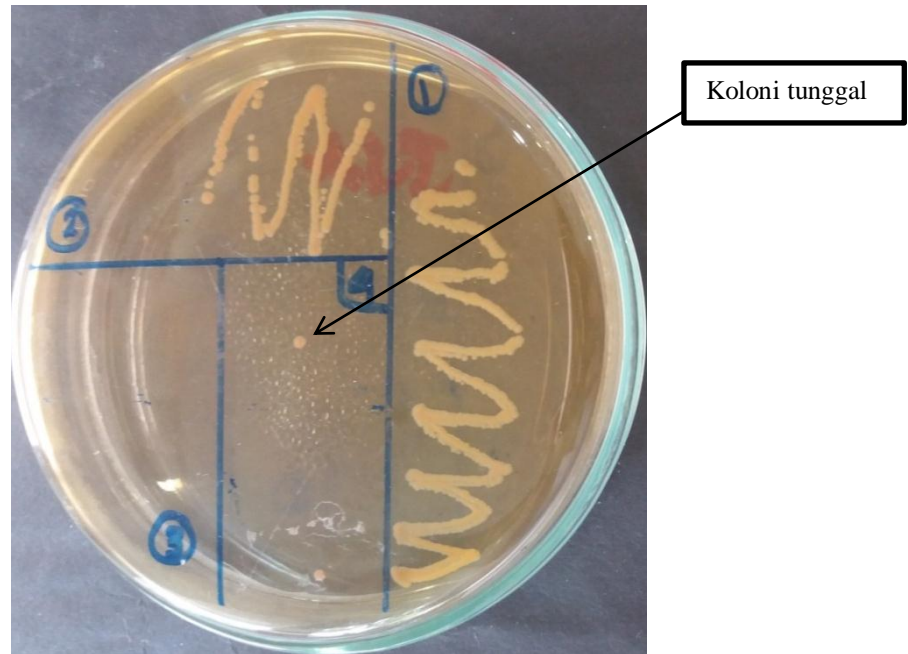
**Lampiran 7. Hasil Identifikasi kimia fraksinasi dari ekstrak daun belimbing wuluh**

| Kandungan Kimia  | Gambar Identifikasi   |  |   |
|------------------|---|--|---|
|                  | Fraksi <i>n</i> -Heksan   | Fraksi Etil Asetat   | Fraksi Air  |
| <b>Flavonoid</b> |   |   |   |
| <b>Saponin</b>   |  |  |  |

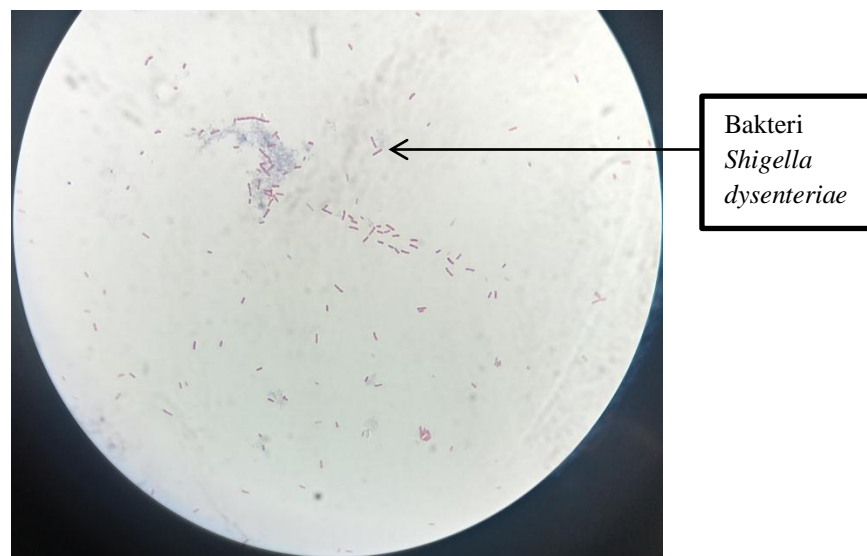
|                 |  |   |  |
|-----------------|--|---|--|
| <b>Tanin</b>    |   |   |   |
| <b>Alkaloid</b> |  |  |  |



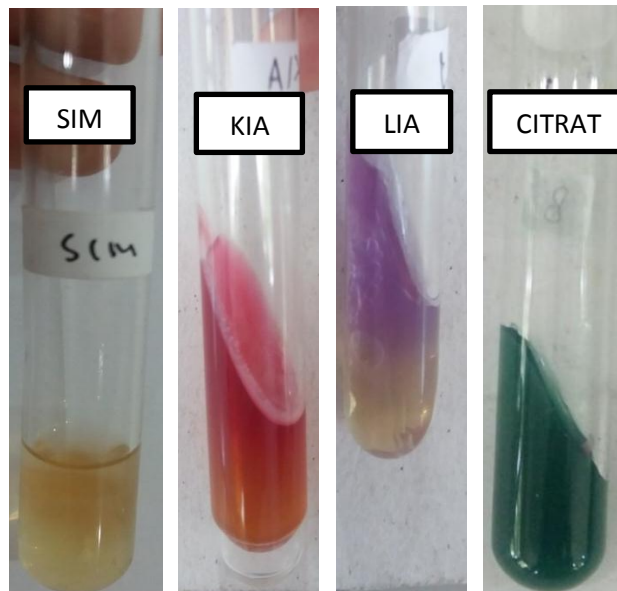
Lampiran 8. Gambar identifikasi secara goresan bakteri *Shigella dysenteriae* di media SSA



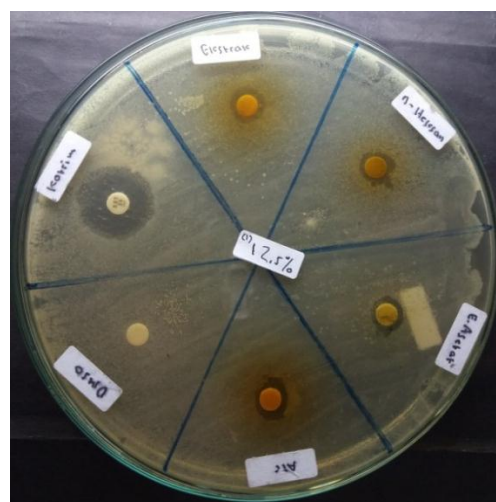
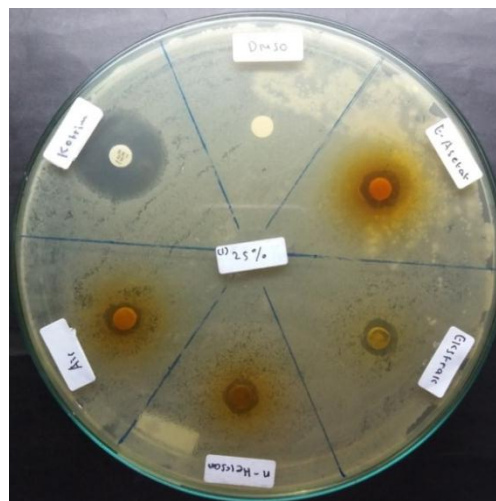
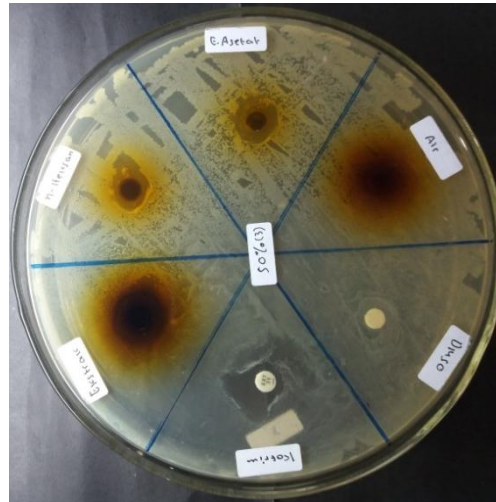
Lampiran 9. Gambar uji mikroskopis bakteri *Shigella dysenteriae* dengan pewarnaan Gram



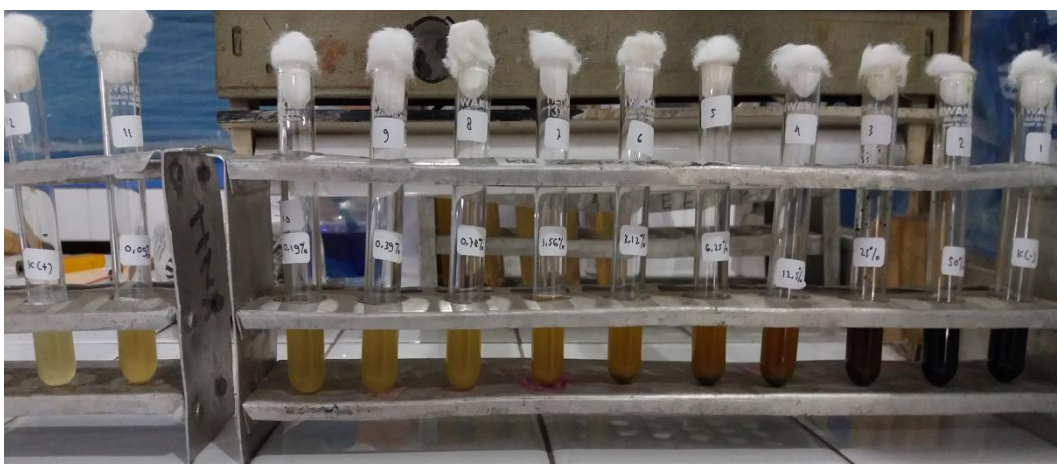
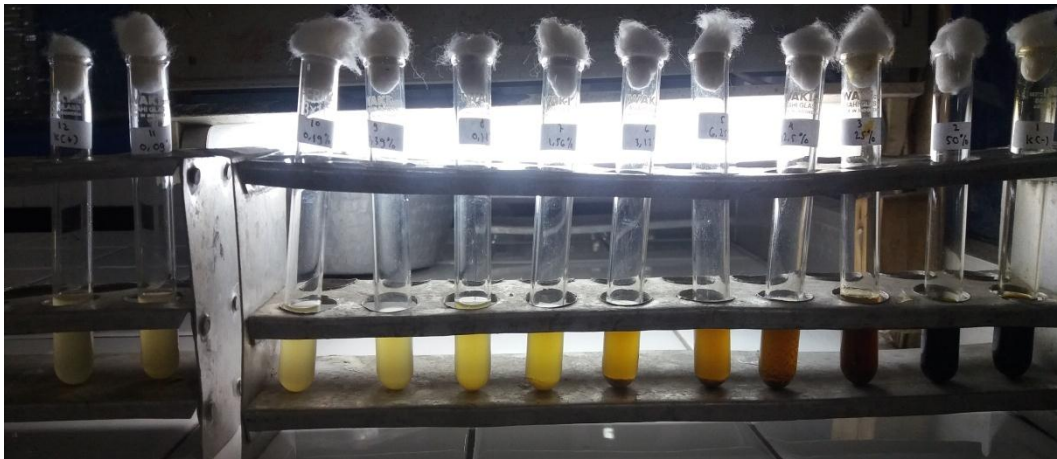
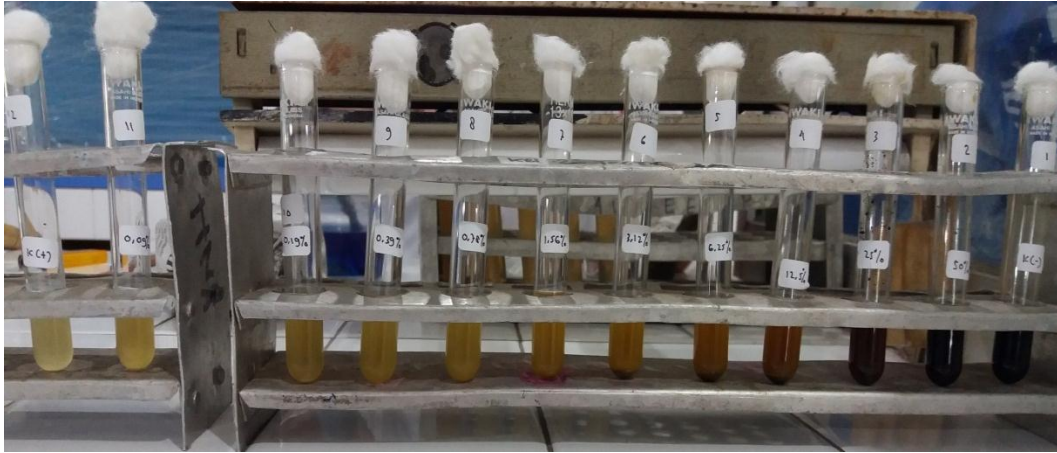
**Lampiran 10. Hasil identifikasi bakteri *Shigella dysenteriae* dengan media SIM, KIA, LIA dan CITRAT**

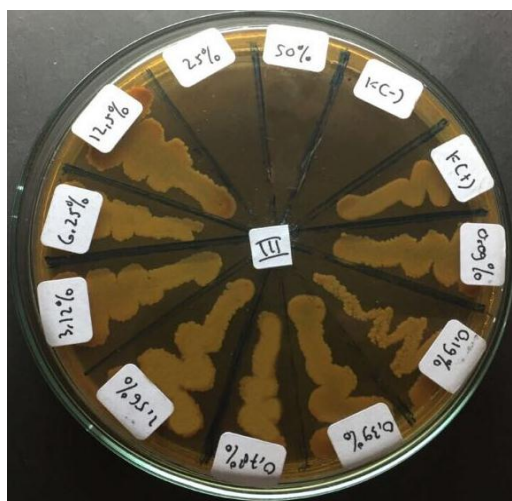
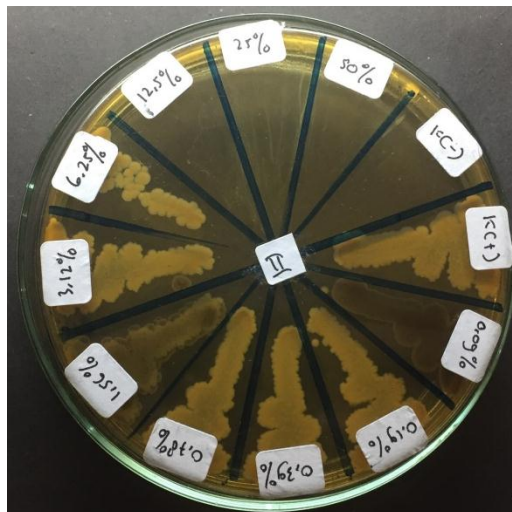
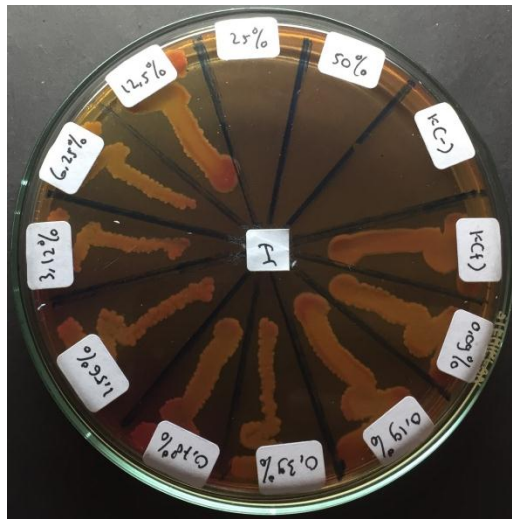


Lampiran 11. Hasil uji aktivitas fraksi dan ekstrak dari daun belimbing wuluh terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* secara difusi



**Lampiran 12. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun belimbing terhadap *Shigella dysenteriae* secara dilusi**





Hasil inokulasi dari fraksi teraktif pada media SSA

**Lampiran 13. Hasil prosentase bobot kering terhadap bobot basah**

| Bobot basah (gram) | Bobot kering (gram) | Prosentase (%) |
|--------------------|---------------------|----------------|
| 6000               | 1700                | 28,33          |

Perhitungan bobot kering terhadap bobot basah adalah

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

$$= \frac{1700}{6000} \times 100\%$$

Maka prosentase bobot kering terhadap bobot basah adalah 28,33%

**Lampiran 14. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh secara *moisture balance***

| Berat awal (g) | Berat akhir | Kadar (%) |
|----------------|-------------|-----------|
| 2,00           | 1,67        | 6,7       |
| 2,00           | 1,65        | 5,7       |
| 2,00           | 1,66        | 6,7       |
| Rata-rata      |             | 6,36      |

Jadi kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh adalah 6,36 % berarti kurang dari 10%.

**Lampiran 15. Hasil perhitungan persen rendemen maserasi ekstrak daun belimbing wuluh**

| Bahan serbuk (g) | Berat ekstrak | Rendemen (% b/b) |
|------------------|---------------|------------------|
| 500              | 30,95         | 6,19             |

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

$$= \frac{30,95}{500} \times 100\%$$

Jadi rendemen ekstrak ekstrak daun belimbing wuluh terhadap berat serbuk daun belimbing wuluh adalah 6,19 %.

**Lampiran 16. Hasil rendemen fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air ekstrak daun belimbing wuluh**

| Bobot ekstrak (g) | Bobot fraksi (g) | Prosentase % ( <sup>b</sup> / <sub>b</sub> ) |
|-------------------|------------------|--|
| 20                | <i>n</i> -heksan | 3,95   |
| 20                | etil asetat      | 14,05  |
| 20                | air              | 34,65  |

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen fraksi } n\text{-heksan} &= \frac{\text{Bobot fraksi (g)}}{\text{Bobot ekstrak (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{1,58}{20} \times 100\% \\
 &= 3,95\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen fraksi etil asetat} &= \frac{\text{Berat fraksi (g)}}{\text{Bobot ekstrak(g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{2,81}{20} \times 100\% \\
 &= 14,05\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen fraksi air} &= \frac{\text{Berat fraksi (g)}}{\text{Bobot ekstrak(g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{6,93}{20} \times 100\% \\
 &= 34,65\%
 \end{aligned}$$

**Lampiran 17. Perhitungan diameter hambat pada uji aktivitas antibakteri daun belimbing wuluh terhadap *Shigella dysenteriae***

| Sediaan uji                        | Konsentrasi<br>(% <sup>b</sup> /v) | Diameter zona hambat |      |      | Rata-rata ±SD |
|------------------------------------|------------------------------------|----------------------|------|------|---------------|
|                                    |                                    | Replikasi            |      |      |               |
|                                    |                                    | I                    | II   | III  |               |
| Ekstrak                            | 50%                                | 8,5                  | 8,9  | 8,3  | 8,56±0,305    |
|                                    | 25%                                | 8,1                  | 8    | 7,9  | 8,0±0,1       |
|                                    | 12,5%                              | 7,7                  | 7,5  | 7,7  | 7,63±0,115    |
| Fraksi <i>n</i> -heksan            | 50%                                | 7,2                  | 7    | 7,1  | 7,1±0,1       |
|                                    | 25%                                | 6,9                  | 7,1  | 6,8  | 6,93±0,152    |
|                                    | 12,5%                              | 6,9                  | 6,7  | 6,4  | 6,55±0,251    |
| Fraksi Etil asetat                 | 50%                                | 12                   | 12,5 | 12,8 | 12,43±0,404   |
|                                    | 25%                                | 11,9                 | 12   | 12,2 | 12,03±0,624   |
|                                    | 12,5%                              | 12,1                 | 11,9 | 11,5 | 11,83±0,305   |
| Fraksi Air                         | 50%                                | 6,1                  | 6    | 6,3  | 7,03±0,152    |
|                                    | 25%                                | 6,4                  | 6,2  | 5,9  | 6,16±0,251    |
|                                    | 12,5%                              | 6,0                  | 5,8  | 6,1  | 5,9±0,152     |
| Kontrol positif<br>(Kotrimoksazol) | (+)                                | 22,6                 | 22,9 | 22,8 | 22,7±0,152    |
| Kontrol negatif<br>(DMSO 5%)       | (-)                                | 0                    | 0    | 0    | 0±0           |

**Lampiran 18. Perhitungan pengenceran DMSO (Dimethyl Sulfoxida)**

Pembuatan DMSO konsentrasi 5 %

$$\begin{aligned}
 V_1.C_1 &= V_2.C_2 \\
 V_1.100\% &= 100 \text{ ml. } 5 \text{ ml} \\
 &= \frac{100 \text{ ml. } 5 \text{ \%}}{100\%} \\
 &= \frac{500 \text{ ml}}{100\%} \\
 &= 5 \text{ ml}
 \end{aligned}$$



### Lampiran 19. Pembuatan larutan stok konsentrasi uji difusi

1. Konsentrasi 50%

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

Ditimbang 1 gram fraksi etil asetat daun belimbing wuluh kemudian dimasukkan dalam vial dan diencerka dengan DMSO 5% ad 2 ml.

2. Konsentrasi 25%

$$\text{Rumus} \quad V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$1 \text{ ml} \cdot 50\% = 2 \text{ ml} \cdot C_2$$

$$C_2 = 25\%$$

Dipipet 1 ml larutan induk konsentrasi 50% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 2 ml.

3. Konsentrasi 12,5%

$$\text{Rumus} \quad V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$1 \text{ ml} \cdot 25\% = 2 \text{ ml} \cdot C_2$$

$$C_2 = 12,5\%$$

Dipipet 1 ml larutan induk konsentrasi 25% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 2 ml.

### Lampiran 20. Pembuatan larutan stok konsentrasi uji dilusi

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

Konsentrasi 50% = 2 gram/ 4 ml

Konsentrasi 25%  $V_1.C_1 = V_2.C_2$

$$1 \text{ ml}.50\% = 2 \text{ ml}.C_2$$

$$C_2 = 25\%$$

Konsentrasi 12,5% =  $V_1.C_2 = V_2.C_2$

$$1 \text{ ml}.25\% = 2 \text{ ml}.C_2$$

$$C_2 = 12,5\%$$

Konsentrasi 6,25% =  $V_1.C_1 = V_2.C_2$

$$1 \text{ ml}.12,5\% = 2 \text{ ml}.C_2$$

$$C_2 = 6,25\%$$

Konsentrasi 3,125% =  $V_1.C_1 = V_2.C_2$

$$1 \text{ ml}.6,25\% = 2 \text{ ml}.C_2$$

$$C_2 = 3,125\%$$

Konsentrasi 1,563% =  $V_1.C_1 = V_2.C_2$

$$1 \text{ ml}.3,12\% = 2 \text{ ml}.C_2$$

$$C_2 = 1,56\%$$

Konsentrasi 0,781% =  $V_1.C_1 = V_2.C_2$

$$1 \text{ ml}.1,56\% = 2 \text{ ml}.C_2$$

$$C_2 = 0,78\%$$

Konsentrasi 0,391% =  $V_1.C_1 = V_2.C_2$

$$1 \text{ ml}.0,78\% = 2 \text{ ml}.C_2$$

$$C_2 = 0,39\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,196\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$1 \text{ ml} \cdot 0,390\% = 2 \text{ ml} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,19\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,098\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$1 \text{ ml} \cdot 0,19\% = 2 \text{ ml} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,09\%$$

Kontrol negatif (-) berisi 1 ml fraksi etil asetat

Kontrol positif (+) berisi 1 ml suspensi bakteri *Shigella dysenteriae*

## Lampiran 21. Pembuatan Media

### 1. Medium BHI (*Brain Heart Infusion*)

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| Brain infusion              | 12,5 gram |
| Heart infusion              | 5,0 gram  |
| Protease peptone            | 10,0 gram |
| Glucose                     | 2,0 gram  |
| Sodium chloride             | 5,0 gram  |
| Disodium hydrogen phosphate | 2,5 gram  |
| Aquadestilata ad            | 1000 ml   |
| pH                          | 7,4       |

Semua bahan dilarutkan dalam aquadest sebanyak 100 ml dipanaskan sampai larut sempurna, dimasukkan dalam tabung reaksi steril, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

### 2. Medium MHA (*Mueller Hinton Agar*)

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| Meat infusion       | 2,0 gram  |
| Bacto asam kasamino | 17,5 gram |
| Kanji               | 1,5 gram  |
| Agar                | 17,0 gram |

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.

### 3. Medium SIM (*Sulfida Indol Motility*)

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| Peptone from casein        | 20 gram   |
| Peptone from meat          | 6 gram    |
| Ammonium iron (II) citrate | 0,2 gram  |
| Sodium thiosulfate         | 0,2 gram  |
| Agar-agar                  | 0,2 gram  |
| pH                         | 7,3 ± 0,1 |
| Aquadestilata ad           | 1000 ml   |

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

4. Medium KIA (*Kliger Iron Agar*)

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

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

5. Medium LIA (*Lysine Iron Agar*)

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| Peptone from meat           | 5,0 gram  |
| Yeast extract               | 3,0 gram  |
| D (+) glucose               | 1,0 gram  |
| L-Lysine monohydrochloride  | 10,0 gram |
| Sodium thiosulfate          | 0,04 gram |
| Ammonium iron (III) citrate | 0,5 gram  |
| Bromochreosol purple        | 0,02 gram |
| Agar-agar                   | 12,0 gram |
| pH                          | 6,7 ± 0,1 |
| aquadestilata ad            | 1000 ml   |

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

6. Medium Citrat

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| Ammonium dihydrogen phosphate  | 1,0 gram  |
| Di-potasium hydrogen phosphate | 1,0 gram  |
| Sodium chloride                | 5,0 gram  |
| Sodium citrate                 | 2,0 gram  |
| Magnesium sulfate              | 0,2 gram  |
| Bromolhymol blue               | 0,08 gram |
| Agar-agar                      | 12,0 gram |
| pH                             | 6,9 ± 0,1 |
| aquadestilata ad               | 1000 ml   |

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

7. Medium SSA (*Salmonella Shigella Agar*)

|                    |              |
|--------------------|--------------|
| Lab Lenco Powder   | 5,0 gram     |
| Peptone            | 5,0 gram     |
| Lactose            | 10,0 gram    |
| Bile salts         | 8,5 gram     |
| Sodium citrate     | 10,0 gram    |
| Sodium thiosulfate | 8,5 gram     |
| Feric citrate      | 1,0 gram     |
| Brilliant green    | 0,00033 gram |
| Neutral red        | 0,0025 gram  |
| Agar               | 15,0 gram    |
| pH                 | 7,0 gram     |
| aquadestilata      | 1000 ml      |

Semua bahan dilarutkan dalam aquadestilata sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian dituang pada tabung reaksi steril tanpa diautoklaf.

### Lampiran 22. Pembuatan suspensi Mc Farland 0,5

Sebanyak 0,5 ml larutan barium klorida 0,04 M ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,175%)

Dicampurkan dengan 9,5 ml larutan asam sulfat 0,18 M ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 %  $\text{b/v}$ )

Dalam labu takar dan dihomogenkan. Suspensi ini digunakan sebagai larutan standar pembanding kekeruhan suspensi bakteri.

### Lampiran 23. Analisis Data

Descriptive Statistics

|                | N  | Mean   | Std. Deviation | Minimum | Maximum |
|----------------|----|--------|----------------|---------|---------|
| diameterhambat | 42 | 8.7310 | 4.99343        | .00     | 22.90   |

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

|                                  |                | diameterhambat |
|----------------------------------|----------------|----------------|
| N                                |                | 42             |
| Normal Parameters <sup>a,b</sup> | Mean           | 8.7310         |
|                                  | Std. Deviation | 4.99343        |
| Most Extreme Differences         | Absolute       | .209           |
|                                  | Positive       | .209           |
|                                  | Negative       | -.207          |
| Kolmogorov-Smirnov Z             |                | 1.354          |
| Asymp. Sig. (2-tailed)           |                | .051           |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### Oneway

Test of Homogeneity of Variances

diameterhambat

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.723            | 13  | 28  | .111 |

## ANOVA

diameterhambat

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F        | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|------|
| Between Groups | 1021.056       | 13 | 78.543      | 1754.680 | .000 |
| Within Groups  | 1.253          | 28 | .045        |          |      |
| Total          | 1022.310       | 41 |             |          |      |

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

diameterhambat  
Tukey HSD

| (I) perlakuan            | (J) perlakuan            | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.   | 95% Confidence Interval |             |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------|------------|--------|-------------------------|-------------|
|                          |                          |                       |            |        | Lower Bound             | Upper Bound |
| ekstrak 50%              | ekstrak 25%              | .56667                | .17275     | .114   | -.0657                  | 1.1990      |
|                          | ekstrak 12,5%            | .93333                | .17275     | .001   | .3010                   | 1.5657      |
|                          | fraksi n-heksan 50%      | 1.46667               | .17275     | .000   | .8343                   | 2.0990      |
|                          | fraksi n-heksan 25%      | 1.63333               | .17275     | .000   | 1.0010                  | 2.2657      |
|                          | fraksi n-heksan 12,5%    | 1.90000               | .17275     | .000   | 1.2677                  | 2.5323      |
|                          | fraksi etil asetat 50%   | -3.86667              | .17275     | .000   | -4.4990                 | -3.2343     |
|                          | fraksi etil asetat 25%   | -3.46667              | .17275     | .000   | -4.0990                 | -2.8343     |
|                          | fraksi etil asetat 12,5% | -3.26667              | .17275     | .000   | -3.8990                 | -2.6343     |
|                          | fraksi air 50%           | 2.43333               | .17275     | .000   | 1.8010                  | 3.0657      |
|                          | fraksi air 25%           | 2.40000               | .17275     | .000   | 1.7677                  | 3.0323      |
|                          | fraksi air 12,5%         | 2.60000               | .17275     | .000   | 1.9677                  | 3.2323      |
|                          | kotrimoksazol            | -14.20000             | .17275     | .000   | -14.8323                | -13.5677    |
|                          | 14                       | 8.56667               | .17275     | .000   | 7.9343                  | 9.1990      |
|                          | ekstrak 25%              | ekstrak 50%           | -.56667    | .17275 | .114                    | -1.1990     |
| ekstrak 12,5%            |                          | .36667                | .17275     | .681   | -.2657                  | .9990       |
| fraksi n-heksan 50%      |                          | .90000                | .17275     | .001   | .2677                   | 1.5323      |
| fraksi n-heksan 25%      |                          | 1.06667               | .17275     | .000   | .4343                   | 1.6990      |
| fraksi n-heksan 12,5%    |                          | 1.33333               | .17275     | .000   | .7010                   | 1.9657      |
| fraksi etil asetat 50%   |                          | -4.43333              | .17275     | .000   | -5.0657                 | -3.8010     |
| fraksi etil asetat 25%   |                          | -4.03333              | .17275     | .000   | -4.6657                 | -3.4010     |
| fraksi etil asetat 12,5% |                          | -3.83333              | .17275     | .000   | -4.4657                 | -3.2010     |
| fraksi air 50%           |                          | 1.86667               | .17275     | .000   | 1.2343                  | 2.4990      |
| fraksi air 25%           |                          | 1.83333               | .17275     | .000   | 1.2010                  | 2.4657      |
| fraksi air 12,5%         |                          | 2.03333               | .17275     | .000   | 1.4010                  | 2.6657      |
| kotrimoksazol            |                          | -14.76667             | .17275     | .000   | -15.3990                | -14.1343    |
| 14                       |                          | 8.00000               | .17275     | .000   | 7.3677                  | 8.6323      |



|                          |                          |             |          |        |          |          |
|--------------------------|--------------------------|-------------|----------|--------|----------|----------|
| ekstrak 12,5%            | ekstrak 50%              | - .93333    | .17275   | .001   | -1.5657  | -.3010   |
|                          | ekstrak 25%              | -.36667     | .17275   | .681   | -.9990   | .2657    |
|                          | fraksi n-heksan 50%      | .53333      | .17275   | .167   | -.0990   | 1.1657   |
|                          | fraksi n-heksan 25%      | .70000      | .17275   | .020   | .0677    | 1.3323   |
|                          | fraksi n-heksan 12,5%    | .96667      | .17275   | .000   | .3343    | 1.5990   |
|                          | fraksi etil asetat 50%   | -4.80000    | .17275   | .000   | -5.4323  | -4.1677  |
|                          | fraksi etil asetat 25%   | -4.40000    | .17275   | .000   | -5.0323  | -3.7677  |
|                          | fraksi etil asetat 12,5% | -4.20000    | .17275   | .000   | -4.8323  | -3.5677  |
|                          | fraksi air 50%           | 1.50000     | .17275   | .000   | .8677    | 2.1323   |
|                          | fraksi air 25%           | 1.46667     | .17275   | .000   | .8343    | 2.0990   |
|                          | fraksi air 12,5%         | 1.66667     | .17275   | .000   | 1.0343   | 2.2990   |
|                          | kotrimoksazol            | -15.13333   | .17275   | .000   | -15.7657 | -14.5010 |
|                          | 14                       | 7.63333     | .17275   | .000   | 7.0010   | 8.2657   |
|                          | fraksi n-heksan 50%      | ekstrak 50% | -1.46667 | .17275 | .000     | -2.0990  |
| ekstrak 25%              |                          | -.90000     | .17275   | .001   | -1.5323  | -.2677   |
| ekstrak 12,5%            |                          | -.53333     | .17275   | .167   | -1.1657  | .0990    |
| fraksi n-heksan 25%      |                          | .16667      | .17275   | .999   | -.4657   | .7990    |
| fraksi n-heksan 12,5%    |                          | .43333      | .17275   | .437   | -.1990   | 1.0657   |
| fraksi etil asetat 50%   |                          | -5.33333    | .17275   | .000   | -5.9657  | -4.7010  |
| fraksi etil asetat 25%   |                          | -4.93333    | .17275   | .000   | -5.5657  | -4.3010  |
| fraksi etil asetat 12,5% |                          | -4.73333    | .17275   | .000   | -5.3657  | -4.1010  |
| fraksi air 50%           |                          | .96667      | .17275   | .000   | .3343    | 1.5990   |
| fraksi air 25%           |                          | .93333      | .17275   | .001   | .3010    | 1.5657   |
| fraksi air 12,5%         |                          | 1.13333     | .17275   | .000   | .5010    | 1.7657   |
| kotrimoksazol            |                          | -15.66667   | .17275   | .000   | -16.2990 | -15.0343 |
| 14                       |                          | 7.10000     | .17275   | .000   | 6.4677   | 7.7323   |
| fraksi n-heksan 25%      |                          | ekstrak 50% | -1.63333 | .17275 | .000     | -2.2657  |
|                          | ekstrak 25%              | -1.06667    | .17275   | .000   | -1.6990  | -.4343   |
|                          | ekstrak 12,5%            | -.70000     | .17275   | .020   | -1.3323  | -.0677   |
|                          | fraksi n-heksan 50%      | -.16667     | .17275   | .999   | -.7990   | .4657    |
|                          | fraksi n-heksan 12,5%    | .26667      | .17275   | .947   | -.3657   | .8990    |
|                          | fraksi etil asetat 50%   | -5.50000    | .17275   | .000   | -6.1323  | -4.8677  |
|                          | fraksi etil asetat 25%   | -5.10000    | .17275   | .000   | -5.7323  | -4.4677  |
|                          | fraksi etil asetat 12,5% | -4.90000    | .17275   | .000   | -5.5323  | -4.2677  |
|                          | fraksi air 50%           | .80000      | .17275   | .005   | .1677    | 1.4323   |
|                          | fraksi air 25%           | .76667      | .17275   | .008   | .1343    | 1.3990   |
|                          | fraksi air 12,5%         | .96667      | .17275   | .000   | .3343    | 1.5990   |
|                          | kotrimoksazol            | -15.83333   | .17275   | .000   | -16.4657 | -15.2010 |
|                          | 14                       | 6.93333     | .17275   | .000   | 6.3010   | 7.5657   |
|                          | fraksi n-heksan 12,5%    | ekstrak 50% | -1.90000 | .17275 | .000     | -2.5323  |
| ekstrak 25%              |                          | -1.33333    | .17275   | .000   | -1.9657  | -.7010   |
| ekstrak 12,5%            |                          | -.96667     | .17275   | .000   | -1.5990  | -.3343   |
| fraksi n-heksan 50%      |                          | -.43333     | .17275   | .437   | -1.0657  | .1990    |
| fraksi n-heksan 25%      |                          | -.26667     | .17275   | .947   | -.8990   | .3657    |

|                          |                          |           |        |      |          |          |
|--------------------------|--------------------------|-----------|--------|------|----------|----------|
|                          | fraksi etil asetat 50%   | -5.76667  | .17275 | .000 | -6.3990  | -5.1343  |
|                          | fraksi etil asetat 25%   | -5.36667  | .17275 | .000 | -5.9990  | -4.7343  |
|                          | fraksi etil asetat 12,5% | -5.16667  | .17275 | .000 | -5.7990  | -4.5343  |
|                          | fraksi air 50%           | .53333    | .17275 | .167 | -.0990   | 1.1657   |
|                          | fraksi air 25%           | .50000    | .17275 | .238 | -.1323   | 1.1323   |
|                          | fraksi air 12,5%         | .70000    | .17275 | .020 | .0677    | 1.3323   |
|                          | kotrimoksazol            | -16.10000 | .17275 | .000 | -16.7323 | -15.4677 |
|                          | 14                       | 6.66667   | .17275 | .000 | 6.0343   | 7.2990   |
| fraksi etil asetat 50%   | ekstrak 50%              | 3.86667   | .17275 | .000 | 3.2343   | 4.4990   |
|                          | ekstrak 25%              | 4.43333   | .17275 | .000 | 3.8010   | 5.0657   |
|                          | ekstrak 12,5%            | 4.80000   | .17275 | .000 | 4.1677   | 5.4323   |
|                          | fraksi n-heksan 50%      | 5.33333   | .17275 | .000 | 4.7010   | 5.9657   |
|                          | fraksi n-heksan 25%      | 5.50000   | .17275 | .000 | 4.8677   | 6.1323   |
|                          | fraksi n-heksan 12,5%    | 5.76667   | .17275 | .000 | 5.1343   | 6.3990   |
|                          | fraksi etil asetat 25%   | .40000    | .17275 | .558 | -.2323   | 1.0323   |
|                          | fraksi etil asetat 12,5% | .60000    | .17275 | .076 | -.0323   | 1.2323   |
|                          | fraksi air 50%           | 6.30000   | .17275 | .000 | 5.6677   | 6.9323   |
|                          | fraksi air 25%           | 6.26667   | .17275 | .000 | 5.6343   | 6.8990   |
|                          | fraksi air 12,5%         | 6.46667   | .17275 | .000 | 5.8343   | 7.0990   |
|                          | kotrimoksazol            | -10.33333 | .17275 | .000 | -10.9657 | -9.7010  |
|                          | 14                       | 12.43333  | .17275 | .000 | 11.8010  | 13.0657  |
| fraksi etil asetat 25%   | ekstrak 50%              | 3.46667   | .17275 | .000 | 2.8343   | 4.0990   |
|                          | ekstrak 25%              | 4.03333   | .17275 | .000 | 3.4010   | 4.6657   |
|                          | ekstrak 12,5%            | 4.40000   | .17275 | .000 | 3.7677   | 5.0323   |
|                          | fraksi n-heksan 50%      | 4.93333   | .17275 | .000 | 4.3010   | 5.5657   |
|                          | fraksi n-heksan 25%      | 5.10000   | .17275 | .000 | 4.4677   | 5.7323   |
|                          | fraksi n-heksan 12,5%    | 5.36667   | .17275 | .000 | 4.7343   | 5.9990   |
|                          | fraksi etil asetat 50%   | -.40000   | .17275 | .558 | -1.0323  | .2323    |
|                          | fraksi etil asetat 12,5% | .20000    | .17275 | .995 | -.4323   | .8323    |
|                          | fraksi air 50%           | 5.90000   | .17275 | .000 | 5.2677   | 6.5323   |
|                          | fraksi air 25%           | 5.86667   | .17275 | .000 | 5.2343   | 6.4990   |
|                          | fraksi air 12,5%         | 6.06667   | .17275 | .000 | 5.4343   | 6.6990   |
|                          | kotrimoksazol            | -10.73333 | .17275 | .000 | -11.3657 | -10.1010 |
|                          | 14                       | 12.03333  | .17275 | .000 | 11.4010  | 12.6657  |
| fraksi etil asetat 12,5% | ekstrak 50%              | 3.26667   | .17275 | .000 | 2.6343   | 3.8990   |
|                          | ekstrak 25%              | 3.83333   | .17275 | .000 | 3.2010   | 4.4657   |
|                          | ekstrak 12,5%            | 4.20000   | .17275 | .000 | 3.5677   | 4.8323   |
|                          | fraksi n-heksan 50%      | 4.73333   | .17275 | .000 | 4.1010   | 5.3657   |
|                          | fraksi n-heksan 25%      | 4.90000   | .17275 | .000 | 4.2677   | 5.5323   |
|                          | fraksi n-heksan 12,5%    | 5.16667   | .17275 | .000 | 4.5343   | 5.7990   |
|                          | fraksi etil asetat 50%   | -.60000   | .17275 | .076 | -1.2323  | .0323    |
|                          | fraksi etil asetat 25%   | -.20000   | .17275 | .995 | -.8323   | .4323    |
|                          | fraksi air 50%           | 5.70000   | .17275 | .000 | 5.0677   | 6.3323   |
|                          | fraksi air 25%           | 5.66667   | .17275 | .000 | 5.0343   | 6.2990   |

|                  |                          |           |        |       |          |          |
|------------------|--------------------------|-----------|--------|-------|----------|----------|
|                  | fraksi air 12,5%         | 5.86667   | .17275 | .000  | 5.2343   | 6.4990   |
|                  | kotrimoksazol            | -10.93333 | .17275 | .000  | -11.5657 | -10.3010 |
|                  | 14                       | 11.83333  | .17275 | .000  | 11.2010  | 12.4657  |
| fraksi air 50%   | ekstrak 50%              | -2.43333  | .17275 | .000  | -3.0657  | -1.8010  |
|                  | ekstrak 25%              | -1.86667  | .17275 | .000  | -2.4990  | -1.2343  |
|                  | ekstrak 12,5%            | -1.50000  | .17275 | .000  | -2.1323  | -.8677   |
|                  | fraksi n-heksan 50%      | -.96667   | .17275 | .000  | -1.5990  | -.3343   |
|                  | fraksi n-heksan 25%      | -.80000   | .17275 | .005  | -1.4323  | -.1677   |
|                  | fraksi n-heksan 12,5%    | -.53333   | .17275 | .167  | -1.1657  | .0990    |
|                  | fraksi etil asetat 50%   | -6.30000  | .17275 | .000  | -6.9323  | -5.6677  |
|                  | fraksi etil asetat 25%   | -5.90000  | .17275 | .000  | -6.5323  | -5.2677  |
|                  | fraksi etil asetat 12,5% | -5.70000  | .17275 | .000  | -6.3323  | -5.0677  |
|                  | fraksi air 25%           | -.03333   | .17275 | 1.000 | -.6657   | .5990    |
|                  | fraksi air 12,5%         | .16667    | .17275 | .999  | -.4657   | .7990    |
|                  | kotrimoksazol            | -16.63333 | .17275 | .000  | -17.2657 | -16.0010 |
|                  | 14                       | 6.13333   | .17275 | .000  | 5.5010   | 6.7657   |
| fraksi air 25%   | ekstrak 50%              | -2.40000  | .17275 | .000  | -3.0323  | -1.7677  |
|                  | ekstrak 25%              | -1.83333  | .17275 | .000  | -2.4657  | -1.2010  |
|                  | ekstrak 12,5%            | -1.46667  | .17275 | .000  | -2.0990  | -.8343   |
|                  | fraksi n-heksan 50%      | -.93333   | .17275 | .001  | -1.5657  | -.3010   |
|                  | fraksi n-heksan 25%      | -.76667   | .17275 | .008  | -1.3990  | -.1343   |
|                  | fraksi n-heksan 12,5%    | -.50000   | .17275 | .238  | -1.1323  | .1323    |
|                  | fraksi etil asetat 50%   | -6.26667  | .17275 | .000  | -6.8990  | -5.6343  |
|                  | fraksi etil asetat 25%   | -5.86667  | .17275 | .000  | -6.4990  | -5.2343  |
|                  | fraksi etil asetat 12,5% | -5.66667  | .17275 | .000  | -6.2990  | -5.0343  |
|                  | fraksi air 50%           | .03333    | .17275 | 1.000 | -.5990   | .6657    |
|                  | fraksi air 12,5%         | .20000    | .17275 | .995  | -.4323   | .8323    |
|                  | kotrimoksazol            | -16.60000 | .17275 | .000  | -17.2323 | -15.9677 |
|                  | 14                       | 6.16667   | .17275 | .000  | 5.5343   | 6.7990   |
| fraksi air 12,5% | ekstrak 50%              | -2.60000  | .17275 | .000  | -3.2323  | -1.9677  |
|                  | ekstrak 25%              | -2.03333  | .17275 | .000  | -2.6657  | -1.4010  |
|                  | ekstrak 12,5%            | -1.66667  | .17275 | .000  | -2.2990  | -1.0343  |
|                  | fraksi n-heksan 50%      | -1.13333  | .17275 | .000  | -1.7657  | -.5010   |
|                  | fraksi n-heksan 25%      | -.96667   | .17275 | .000  | -1.5990  | -.3343   |
|                  | fraksi n-heksan 12,5%    | -.70000   | .17275 | .020  | -1.3323  | -.0677   |
|                  | fraksi etil asetat 50%   | -6.46667  | .17275 | .000  | -7.0990  | -5.8343  |
|                  | fraksi etil asetat 25%   | -6.06667  | .17275 | .000  | -6.6990  | -5.4343  |
|                  | fraksi etil asetat 12,5% | -5.86667  | .17275 | .000  | -6.4990  | -5.2343  |
|                  | fraksi air 50%           | -.16667   | .17275 | .999  | -.7990   | .4657    |
|                  | fraksi air 25%           | -.20000   | .17275 | .995  | -.8323   | .4323    |
|                  | kotrimoksazol            | -16.80000 | .17275 | .000  | -17.4323 | -16.1677 |
|                  | 14                       | 5.96667   | .17275 | .000  | 5.3343   | 6.5990   |
| kotrimoksazol    | ekstrak 50%              | 14.20000  | .17275 | .000  | 13.5677  | 14.8323  |
|                  | ekstrak 25%              | 14.76667  | .17275 | .000  | 14.1343  | 15.3990  |

|    |                          |           |        |      |          |          |
|----|--------------------------|-----------|--------|------|----------|----------|
|    | ekstrak 12,5%            | 15.13333  | .17275 | .000 | 14.5010  | 15.7657  |
|    | fraksi n-heksan 50%      | 15.66667  | .17275 | .000 | 15.0343  | 16.2990  |
|    | fraksi n-heksan 25%      | 15.83333  | .17275 | .000 | 15.2010  | 16.4657  |
|    | fraksi n-heksan 12,5%    | 16.10000  | .17275 | .000 | 15.4677  | 16.7323  |
|    | fraksi etil asetat 50%   | 10.33333  | .17275 | .000 | 9.7010   | 10.9657  |
|    | fraksi etil asetat 25%   | 10.73333  | .17275 | .000 | 10.1010  | 11.3657  |
|    | fraksi etil asetat 12,5% | 10.93333  | .17275 | .000 | 10.3010  | 11.5657  |
|    | fraksi air 50%           | 16.63333  | .17275 | .000 | 16.0010  | 17.2657  |
|    | fraksi air 25%           | 16.60000  | .17275 | .000 | 15.9677  | 17.2323  |
|    | fraksi air 12,5%         | 16.80000  | .17275 | .000 | 16.1677  | 17.4323  |
|    | 14                       | 22.76667  | .17275 | .000 | 22.1343  | 23.3990  |
| 14 | ekstrak 50%              | -8.56667  | .17275 | .000 | -9.1990  | -7.9343  |
|    | ekstrak 25%              | -8.00000  | .17275 | .000 | -8.6323  | -7.3677  |
|    | ekstrak 12,5%            | -7.63333  | .17275 | .000 | -8.2657  | -7.0010  |
|    | fraksi n-heksan 50%      | -7.10000  | .17275 | .000 | -7.7323  | -6.4677  |
|    | fraksi n-heksan 25%      | -6.93333  | .17275 | .000 | -7.5657  | -6.3010  |
|    | fraksi n-heksan 12,5%    | -6.66667  | .17275 | .000 | -7.2990  | -6.0343  |
|    | fraksi etil asetat 50%   | -12.43333 | .17275 | .000 | -13.0657 | -11.8010 |
|    | fraksi etil asetat 25%   | -12.03333 | .17275 | .000 | -12.6657 | -11.4010 |
|    | fraksi etil asetat 12,5% | -11.83333 | .17275 | .000 | -12.4657 | -11.2010 |
|    | fraksi air 50%           | -6.13333  | .17275 | .000 | -6.7657  | -5.5010  |
|    | fraksi air 25%           | -6.16667  | .17275 | .000 | -6.7990  | -5.5343  |
|    | fraksi air 12,5%         | -5.96667  | .17275 | .000 | -6.5990  | -5.3343  |
|    | kotrimoksazol            | -22.76667 | .17275 | .000 | -23.3990 | -22.1343 |

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

**Homogeneous Subsets****diameterhambat**Tukey HSD<sup>a</sup>

| perlakuan                | N | Subset for alpha = 0.05 |        |        |        |        |        |        |         |         |
|--------------------------|---|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
|                          |   | 1                       | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8       | 9       |
| DMSO 5%                  | 3 | .0000                   |        |        |        |        |        |        |         |         |
| fraksi air 12,5%         | 3 |                         | 5.9667 |        |        |        |        |        |         |         |
| fraksi air 50%           | 3 |                         | 6.1333 | 6.1333 |        |        |        |        |         |         |
| fraksi air 25%           | 3 |                         | 6.1667 | 6.1667 |        |        |        |        |         |         |
| fraksi n-heksan 12,5%    | 3 |                         |        | 6.6667 | 6.6667 |        |        |        |         |         |
| fraksi n-heksan 25%      | 3 |                         |        |        | 6.9333 |        |        |        |         |         |
| fraksi n-heksan 50%      | 3 |                         |        |        | 7.1000 | 7.1000 |        |        |         |         |
| ekstrak 12,5%            | 3 |                         |        |        |        | 7.6333 | 7.6333 |        |         |         |
| ekstrak 25%              | 3 |                         |        |        |        |        | 8.0000 | 8.0000 |         |         |
| ekstrak 50%              | 3 |                         |        |        |        |        |        | 8.5667 |         |         |
| fraksi etil asetat 12,5% | 3 |                         |        |        |        |        |        |        | 11.8333 |         |
| fraksi etil asetat 25%   | 3 |                         |        |        |        |        |        |        | 12.0333 |         |
| fraksi etil asetat 50%   | 3 |                         |        |        |        |        |        |        | 12.4333 |         |
| kotrimoksazol            | 3 |                         |        |        |        |        |        |        |         | 22.7667 |
| Sig.                     |   | 1.000                   | .995   | .167   | .437   | .167   | .681   | .114   | .076    | 1.000   |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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