

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT
DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SINGKONG
(*Manihot esculenta* Crantz) TERHADAP BAKTERI
Staphylococcus aureus ATCC 25923**



Oleh :

**Indah Utari
20144279 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT
DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SINGKONG
(*Manihot esculenta* Crantz) TERHADAP BAKTERI
Staphylococcus aureus ATCC 25923**

SKRIPSI



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

Oleh:

**Indah Utari
20144279 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

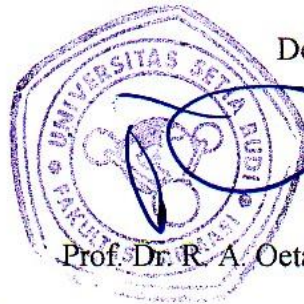
Berjudul
**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT
DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SINGKONG
(*Manihot esculenta* Crantz) TERHADAP BAKTERI
Staphylococcus aureus ATCC 25923**

Oleh
Indah Utari
20144279

Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 28 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,

Drs. Edy Prasetya, M.Si

Penguji :

1. Dr. Ana Indrayati, S.Si., M.Si
2. Drs. Mardiyono, M.Si
3. Desi Purwaningsih, M.Si
4. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt

1.

2.

3.

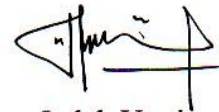
4.

PERNYATAAN

Dengan ini saya nyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar sarjana 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 dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Dan apabila skripsi ini merupakan jiplakkan dari penelitian atau karya ilmiah skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 28 Juni 2018



Indah Utari

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahurabbil' alamin... Alhamdulillahurabbil' alamin... Alhamdulillahurabbil' alamin...

Akhirnya aku sampai ke titik ini,

Sepercik keberhasilan yang Engkau hadiahkan kepadaku ya Rabb

Tak henti-hentinya aku mengucapkan syukur pada Mu ya Rabb

Shalawat dan salam kepada idolaku Rasulullah SAW dan para sahabat yang mulia

*Semoga sebuah karya mungil ini menjadi amal shaleh bagiku dan menjadi kebanggaan bagi keluargaku
tercinta*

Kupersembahkan karya mungil ini..

*Untuk belahan jiwa ku bidadari surga ku yang tanpamu aku bukanlah siapa-siapa di dunia fana ini
Ibuku tersayang (Sarmini) serta orang yang memberikan segala idealisme, prinsip, edukasi dan kasih
sayang berlimpah dengan wajah datar menyimpan kegelisahan ataukah perjuangan yang tidak pernah
ku ketahui, namun tenang temaram dengan penuh kesabaran dan pengertian yang luar biasa Bapakku
tercinta (KARNO) yang telah memberikan segalanya untukku yang tak pernah lelah bekerja keras,
mendo'akan serta membimbingku. Terimakasih atas limpahan kasih dan sayang mu kepadaku yang tak
pernah henti dan belum mampu aku balas..*

*Kepada saudara-saudara ku tercinta (Nenek Iyah, Salva Alin, Ozza Anugerah, Feriska)
terimakasih tiada tara atas support dan do'a yang telah kalian berikan selama ini*

*Kepada teman-teman seperjuangan yang yang tak bisa kusebutkan namanya satu persatu terimakasih
yang tiada tara ku ucapkan*

*Terakhir, untuk seorang yang masih dalam misteri yang dijanjikan Ilahi yang siapapun itu,
terimakasih telah menjadi baik dan bertahan disana.*

Akhir kata, semoga skripsi ini membawa kebermanfaatan.

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur hanya bagi Allah, memuji, memohon pertolongan dan ampunan kepada-Nya. Kami berlandung kepada-Nya dari kejelekan jiwa-jiwa kami dan keburukan perbuatan kami.

pada akhirnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz.) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ”**. Skripsi ini disusun sebagai salah syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi (S. Farm.) di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

Sebuah pembelajaran yang luar biasa bagi penulis selama proses penyelesaian skripsi dan studi S1 Farmasi, oleh sebab itu penulis sampaikan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang senantiasa memberikan anugerah, nikmat serta petunjuk disetiap langkah hidupku. Karena hanya atas izin dan karuniaNya maka skripsi ini dapat dibuat dan selesai pada waktunya.
2. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA. Selaku Rektor Universitas Setia Budi
3. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt., Selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini
4. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan petunjuk, bimbingan dan arahan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Drs. Edy Prasetya, M.si. Selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan petunjuk , bimbingan dan arahan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
6. Tim penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk skripsi ini.
7. Bapak Ibu dosen, karyawan-karyawati, Kru Lab.13, 10, 8, 5 Universitas Setia Budi atas bantuannya selama penulis menempuh skripsi dan studi.

8. Kepada kedua orang tuak saya Bapak Karno dan Ibu Sarmini, yang telah memberikan dukungan moril maupun materi serta do'a yang tiada henti untuk kesuksesan saya, karena tiada kata untuk seindah lantunan do'a dan tiada do'a yang paling khusuk selain doa yang terucap dari orang tua. Ucapan terimakasih saja tidak akan membalas kebaikan orang tua, karena itu terimalah persembahan bakti dan cinta ku untuk kalian Bapak Ibu ku.
9. Saudara saya (Nenek, Pakde, Bude, Ozza, Salva, Rizka), yang senantiasa memberikan dukungan, semangat, senyum dan do'anya untuk keberhasilan ini, terimakasih dan sayangku untuk kalian.
10. Sahabat dan teman tersayang (Mimi, Monicha, Nita, Suryani, Ulfah, Desi, Yeti, Kost Wisma Putri), tanpa semangat, dukungan dan bantuan kalian semua tak akan mungkin aku sampai disini, terimakasih untuk canda tawa, tangis dan perjuangan yang kita lewati bersama.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna karena keterbatasan kemampuan penulis,oleh sebab itu kritik dan saran sangat penulis harapkan demikesempurnaan skripsi ini. Selamat membaca dan semoga bermanfaat. Amin

Surakarta, 28 Juni 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
INTISARI	xv
ABSTRACT	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Klasifikasi Tumbuhan Daun Singkong	6
1. Sistematika tumbuhan	6
1.1. Akar	6
1.2. Batang	7
1.3. Daun	7
1.4. Bunga	7
1.5. Buah	7
2. Khasiat Daun Singkong	7
3. Kandungan kimia daun singkong	8
3.1. Flavonoid	8
3.2. Saponin	9
3.3. Tanin	10
B. Simplisia	10
1. Pengertian simplisia	10
2. Pengumpulan simplisia	10
3. Pengeringan simplisia	10
C. Penyarian	11
1. Definisi ekstrak	11
2. Maserasi	12

3. Fraksinasi	12
4. Pelarut	12
4.1. Etanol	12
4.2. <i>n</i> -heksan	13
4.3. Etil asetat	13
4.4. Air	13
D. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14
1. Sistematika <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14
2. Morfologi dan identifikasi	14
3. Patogenesis	15
E. Media	15
F. Sterilisasi	16
G. Diare	17
H. Kotrimoksazole	17
I. Mekanisme kerja antibakteri.....	18
1. Definisi	18
2. Mekanisme kerja antibakteri	18
J. Uji aktivitas antibakteri	20
1. Metode difusi	20
2. Metode dilusi	21
K. Landasan teori	21
L. Hipotesis	24
BAB III METODE PENELITIAN	25
A. Populasi dan Sampel	25
1. Populasi	25
2. Sampel	25
B. Variabel Penelitian.....	25
1. Identifikasi variabel utama.....	25
2. Klasifikasi variabel utama	25
3. Definisi operasional variabel utama	26
C. Bahan dan Alat.....	27
1. Bahan	27
2. Alat	27
D. Jalannya Penelitian.....	28
1. Determinasi tanaman	28
2. Pembuatan ekstrak simplisia	28
3. Penetapan susut pengeringan daun singkong.....	28
4. Pembuatan ekstrak etanolik daun singkong	29
5. Tes bebas etanol daun singkong	29
6. Fraksinasi	29
7. Identifikasi kandungan kimia serbuk ekstrak daun singkong	29
7.1. Identifikasi flavonoid	30
7.2. Identifikasi saponin	30
7.3. Identifikasi tanin	30
8. Sterilisasi.....	30
9. Identifikasi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923...	30

9.1. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram.....	30
9.2. Identifikasi bakteri secara goresan	31
9.3. Tes katalase	31
9.4. Tes koagulase	31
10. Pembuatan suspensi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	32
11. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif secara difusi	32
12. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif secara dilusi	33
E. Analisis hasil.....	34
 BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	 38
A. Hasil Penelitian dan pembahasan	38
1. Hasil determinasi tanaman daun singkong	38
2. Hasil pengeringan daun singkong	39
3. Hasil penetapan susut pengeringan	40
4. Hasil pembuatan ekstrak daun singkong	41
5. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun singkong	41
6. Hasil fraksinasi ekstrak daun singkong	42
7. Hasil identifikasi kandungan kimia daun singkong	42
8. Hasil identifikasi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	43
8.1. Hasil identifikasi mikroskopis pewarnaan Gram	43
8.2. Hasil metode goresan	44
8.3. Hasil uji katalase	44
8.4. Hasil uji koagulase	44
9. Hasil pembuatan suspensi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	45
10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksinasi daun singkong terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara difusi	45
11. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksinasi daun singkong terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara dilusi	49
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	 51
A. Kesimpulan.....	51
B. Saran.....	51
 DAFTAR PUSTAKA	 52
LAMPIRAN	58

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Pohon daun singkong	6
2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 yang dilihat dari mikroskop elektron	14
3. Skema pembuatan ekstrak etanolik dan fraksinasi daun singkong	35
4. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanolik, fraksi <i>n</i> -heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293 dengan metode difusi	36
5. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293 dengan metode dilusi	37

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Hasil perhitungan rendemen simplisia daun singkong	39
2. Hasil penetapan kadar susut pengeringan serbuk daun singkong	40
3. Hasil rendemen ekstrak etanol daun singkong	41
4. Hasil pemeriksaan bebas etanol ekstrak daun singkong	41
5. Hasil rendemen fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat dan air	42
6. Hasil identifikasi fitokimia secara kualitatif ekstrak, serbuk, dan fraksi daun singkong	43
7. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksinasi daun singkong terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara difusi.....	46
8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksinasi daun singkong terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara dilusi.....	50

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Surat keterangan melakukan identifikasi tanaman	59
2. Foto tanaman daun singkong dan serbuk singkong	60
3. Foto alat oven, inkubator, Vortex, dan Moisture Balance.....	61
4. Foto ekstrak etanolik, evaporator fraksinasi.....	62
5. Foto fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat dan air	63
6. Foto hasil identifikasi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara mikroskopis dan makroskopis	64
7. Foto identifikasi senyawa serbuk, ekstrak dan fraksi daun singkong	65
8. Uji aktivitas antibakteri fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat dan air ekstrak etanol daun singkong	66
9. Hasil dilusi fraksi etil asetat daun singkong terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	66
10. Hasil perhitungan rendemen simplisia daun singkong	67
11. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanolik fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat dan air daun singkong	67
12. Pembuatan larutan stok uji difusi dan dilusi	69
13. Komposisi dan pembuatan media	71
14. Hasil analisa data	73

INTISARI

UTARI, I., 2018 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz.) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz.) memiliki kandungan flavonoid, saponin dan tanin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas dari fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, dan ekstrak etanol daun singkong sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, , mengetahui antara ketiga fraksi yang menghasilkan aktivitas antibakteri yang paling aktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mengetahui nilai Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum dari fraksi yang paling aktif ekstrak daun singkong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Daun singkong diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan air. Aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dengan konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5%, sedangkan metode dilusi dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; dan 0,09%. Kontrol positif menggunakan kotrimoksazole dan kontrol negatif DMSO 5%.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Diameter zona hambat yang paling besar yaitu etil asetat pada konsentrasi 50% dengan rata-rata zona hambat 19,33 mm. fraksi etil asetat merupakan fraksi paling aktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sehingga dilanjutkan dengan metode dilusi dan hasil Konsentrasi Bunuh Minimum 12,5%.

Kata kunci: Singkong, fraksinasi, antibakteri, difusi, dilusi.

ABSTRACT

UTARI, I., 2018. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE, AND WATER FRACTION OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF CASSAVA LEAF (*Manihot esculenta* Crantz.) AGAINST *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

(*Manihot esculenta* Crantz.) leaves containing flavonoids, saponins, and tannins. This research aims to determine the activity of *n*-hexane as antibacterial against the *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, known between the three fraction which resulted in the most active antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, determine the value of Minimum Inhibitory Concentrations and Minimum Killing Concentrations of the most active fraction of cassava leaf extract to *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Cassava leaves were extracted by maceration method using 70% ethanol solvent, then continued with fractionation used *n*-hexane, ethyl acetate, and water solvent. The antibacterial activity used diffusion method concentrated of 50%; 25%; and 12,5%, while dilution method with concentrated of 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; and 0,09%. The positive control used cotrimoxazole and negative control used 5% of DMSO.

The results showed have antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The largest diameter of inhibitory zone was ethyl acetate at concentration of 50% with mean inhibition zone is 19,33 mm. the most active fraction of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 is the ethyl acetate fraction, so it was followed by dilution method and the result of Minimum Killing Concentration is 12,5%.

Keywords : Cassava, fractionations, antibacterial, diffusion, dilution.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Mikroorganisme adalah organisme hidup yang berukuran kecil dan hanya dapat diamati menggunakan mikroskop. Mikroorganisme alami dalam tubuh disebut flora normal tidak bersifat patogen, tetapi dalam kondisi tertentu dapat bersifat patogen dan menimbulkan penyakit infeksi. Infeksi bakteri terjadi bila bakteri mampu melewati barrier mukosa atau kulit dan menembus jaringan tubuh (Pratiwi 2008, PERMENKES 2011).

Penyakit diare merupakan salah satu penyakit utama yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat Indonesia pada saat ini. Angka kejadian diperkirakan 20-50 kejadian diare per 100 penduduk setiap tahunnya (Paramitha *et al.* 2010). Diare adalah gangguan pencernaan yang ditandai dengan penurunan konsentrasi tinja (menjadi lunak atau cair) dalam waktu 24 jam. Gambaran secara klinis diare adalah buang air besar dengan frekuensi tiga kali atau lebih sehingga menyebabkan badan lesu dan lemas, tidak nafsu makan, serta muntah (Jawetz *et al.* 2012).

Stapylococcus aureus merupakan bakteri penyebab diare akut yang di sebabkan karena toksin *Staphylococcus* yang masuk kedalam makanan, karena makanan yang tidak tepat cara pengawetannya (Jawetz, 2007). Walaupun presentase diare sebagai penyebab kematian pada anak di Indonesia dan negara – negara berkembang lainnya cenderung menurun tetapi Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memprediksikan pada tahun 2025 masih akan terjadi 5 juta kematian pada anak usia kurang dari umur lima tahun akibat diare (Nailul, 2013).

Secara klinis penyebab diare dapat dikelompokkan dalam 6 golongan besar yaitu infeksi (disebabkan oleh bakteri, virus, dan infestasi parasit), malabsorpsi, alergi, keracunan, imunodefisiensi dan sebab-sebab lainnya (Depkes RI, 2011). Tjay dan Rahardja (2007) mengklasifikasikan diare ke dalam beberapa jenis berdasarkan penyebabnya sebagai berikut: diare akibat virus, misalnya

rotavirus dan *adenovirus*, diare bakterial invasif diare parasiter akibat protozoa seperti *Entamoeba histolytica* dan *Giardia lamblia*, diare akibat penyakit, diare akibat obat, diare akibat keracunan makanan.

Mekanisme kerja terjadinya diare infeksi meliputi penempelan bakteri pada sel epitel dengan atau tanpa kerusakan mukosa, invasi mukosa, dan produksi enterotoksin atau sitotoksin (Ciesla and Guerrant, 2003). Pada diare infeksi *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* merupakan contoh bakteri penyebabnya. *Staphylococcus aureus* ditemukan sebagai flora normal pada kulit, saluran pernapasan, dan saluran cerna manusia. Bakteri ini dapat bersifat patogen pada manusia. *Staphylococcus aureus* dapat menginfeksi manusia dengan toksin yang terdapat dalam makanan yang tidak tepat cara pengolahan dan pengawetan yang dikonsumsi manusia yang dapat menyebabkan keracunan. Gejala terjadi dalam waktu 1-6 jam setelah asupan makanan terkontaminasi. Sekitar 75% pasien mengalami mual, muntah, nyeri abdomen dan kemudian diikuti diare. Diagnosis 3 dengan biakan *Staphylococcus aureus* dari makan yang terkontaminasi atau dari kotoran dan muntahan pasien (Ciesla and Guerrant, 2003).

Pada zaman modern seperti sekarang ini, beranekaragam obat untuk berbagai macam penyakit bisa diperoleh dengan mudah. Akan tetapi, kebanyakan obat-obatan tersebut merupakan terbuat dari bahan-bahan kimia tertentu. Selain memberikan manfaat, obat-obat seperti itu pasti memiliki efek samping bagi tubuh (Bayu, 2013). Tanaman obat di negara berkembang dan negara maju karena berasal dari alam serta efek samping yang rendah semakin dipopulerkan, sehingga sering digunakan dalam pengembangan obat terhadap berbagai penyakit (Bayu, 2013).

Salah satu alternatif pengobatan untuk penyakit diare adalah dengan menggunakan tanaman obat (Defrin *et al.* 2010). Salah satu tanaman obat yang digunakan oleh mayoritas masyarakat untuk mengobati diare adalah daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) karena memiliki kandungan flavonoid, saponin dan tanin. Senyawa-senyawa tersebut diketahui mempunyai aktivitas sebagai antibakteri (Miladiyah *et al.* 2011).

Penelitian sebelumnya, telah dilakukan evaluasi potensial antibakteri dari ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dimaserasi menggunakan pelarut etanol, menggunakan metode difusi agar dengan cara sumuran. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa diameter zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 0,01325% dari ekstrak etanol adalah 9,32 mm (Cik mutia dkk, 2016). Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa ekstrak etanol daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka peneliti tertarik melakukan penelitian untuk menguji potensi dari fraksi-fraksi daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini perlu dilakukan untuk menguji aktivitas fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap *Staphylococcus aureus*. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan golongan senyawa dan menarik senyawa kimia yang mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* sesuai sifat kepolaran pelarut yang digunakan. Senyawa tersebut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda-beda, dimana senyawa flavonoid bersifat semi polar, sedangkan saponin dan tanin bersifat polar sehingga digunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda pula.

Metode yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas dari bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa zona atau daerah yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap mikroorganisme yang diperiksa (Jawets *et al.* 2007). Metode dilusi berguna untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) (Pratiwi 2008).

B. Perumusan Masalah

Permasalahan yang timbul dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Pertama, apakah fraksi *n*-Heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

Kedua, fraksi manakah (*n*-Heksan, etil asetat, dan air) dari ekstrak etanolik daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang mempunyai aktivitas antibakteri yang paling aktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

Ketiga, Berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi yang paling aktif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

Pertama, mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *n*-Heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanolik daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Kedua, mengetahui antara ketiga fraksi (*n*-Heksan, etil asetat, dan air) dari ekstrak etanolik daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang menghasilkan aktivitas antibakteri yang paling aktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Ketiga, Untuk mengetahui nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi yang paling aktif ekstrak daun singkong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengungkap lebih lanjut mengenai khasiat daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) sebagai antibakteri dan dapat

digunakan sebagai masukan berbagai pihak dalam pengembangan obat alam, serta dapat memberikan landasan ilmiah bagi penelitian selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Klasifikasi Tumbuhan Daun Singkong

1. Sistematika tumbuhan



Gambar No 1. Pohon Daun Singkong

Klasifikasi Tanaman Daun Singkong

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Kelas : Dicotyledone

Ordo : Eurpobiaceae

Genus : Manihot

Spesies : *Manihot esculenta* Crantz (Kurniani, 2009).

1.1. Akar. Sekelompok akar sekunder berkembang pada buku – buku pangkal batang dan tumbuh menyamping. Akar penyokong memberikan tambahan topangan untuk tumbuh tegak dan membantu penyerapan hara. Akar akan membesar dan membentuk umbi. Umbi pada singkong merupakan akar pohon yang membesar dan memanjang, dengan rata – rata bergaris tengah 2 – 3 cm dan

panjang 50 – 80 cm, tergantung dari jenis singkong yang ditanam. Bagian bawah daun tidak berbulu. Umbi pada singkong berasal dari pembesaran sekunder akar adventif. Bagian dalam singkong berwarna putih atau kekuning – kuningan. Umbi pada singkong tidak tahan simpan meskipun ditempatkan di lemari pendingin (Richardo 2012).

1.2. Batang. Menurut Richardo (2012), batang tanaman singkong berbentuk bulat diameter 2,5 – 4 cm, berkayu beruas – ruas dan panjang. Ketinggiannya dapat mencapai 1 – 4 meter. Warna batang bervariasi tergantung dari kulit luar, tetapi batang yang masih muda umumnya berwarna hijau dan pada saat tua berubah keputih – putihan, kelabu, hijau kelabu, atau coklat kelabu. Empulur batang berwarna putih, lunak, dan strukturnya empuk seperti gabus.

1.3. Daun. Daun singkong tumbuh di sepanjang batang dengan tangkai yang panjang. Daun singkong berwarna kehijauan dan tulang daun yang majemuk menjari dengan anak daun berbentuk elips yang berujung runcing. Warna daun muda hijau kekuningan atau hijau keunguan. Tangkai daun panjang dengan warna hijau, merah, kuning, atau kombinasi dari ketiganya (Richardo 2012).

1.4. Bunga. Bunga pada tanaman singkong muncul pada ketiak percabangan. Bunga betina lebih dulu muncul dan matang. Tanaman singkong bunganya berumah satu (*monoecius*) dan proses penyerbukannya bersifat silang. Jika selama 24 jam bunga betina tidak dibuahi bunga akan layu dan gugur (Richardo 2012)

1.5. Buah. Buah pada tanaman singkong disebut sebagai umbi. Umbi pada tanaman singkong ini terbentuk dari akar yang berubah bentuk dan fungsinya sebagai tempat penyimpanan makanan cadangan. Bentuk umbi pada tanaman singkong bermacam-macam, namun kebanyakan berbentuk silinder, bercabang, meruncing, bulat, dan memanjang. Sedangkan daging umbi mengandung zat pati berwarna putih gelap dan tanaman menghasilkan 5-10 buah (Richardo 2012)

2. Khasiat daun singkong

Daun singkong mengandung sekitar 17% protein karena merupakan suatu tanaman sumber protein yang baik bagi kepentingan diet (Kartasapoetra, 1988). Daun singkong mengandung vitamin A, B1, dan C. Nilai vitamin A yang terkandung dalam 100 gram daun singkong mencapai 3.300 RE (Oei, 2008). Dari

berbagai analisis disebutkan, daun singkong dapat membantu mengubah karbohidrat menjadi energi, membantu pemulihan kulit dan tulang, meningkatkan daya ingat, mood, kinerja otak dan metabolisme asam amino lain. Dalam setiap 100 gram daun singkong mengandung 3.300 RE vitamin A yang baik untuk kesehatan mata dan vitamin C sebanyak 275 mg yang baik untuk mencegah sariawan, dan meningkatkan kekebalan tubuh, membantu menangkal radikal bebas, dan melindungi sel dari kerusakan oksidasi. Yang tidak kalah penting, kandungan serat pada daun singkong yang cukup tinggi sehingga dapat membantu melancarkan buang air besar (Oei,2008).

Khasiat dari daun singkong, antara lain untuk demam, sakit kepala, diare, dan mata sering kabur. Selain itu, daun singkong juga dapat menambah nafsu makan. Daun singkong yang dikonsumsi secara rutin juga dapat mencegah aterosklerosis (penimbunan lemak di dinding pembuluh darah) yang bisa berdampak pada serangan jantung (Anonim, 2011).

Dikarenakan proses pengolahan pada daun singkong yang masih terbatas, dan dengan didukung banyaknya kandungan gizi serta manfaat yang dimiliki daun singkong, maka dilakukan suatu modifikasi produk atau diversifikasi produk untuk meningkatkan nilai ekonomis daun singkong, dan meningkatkan daya simpan produk dari daun singkong yaitu dengan nori imitasi daun singkong.

3. Kandungan kimia daun singkong

Daun singkong memiliki berbagai kandungan yaitu, flavonoid, triterpenoid, saponin, tannin dan vitamin C (Nurdiana, 2013). Menurut hasil penelitian, daun singkong termasuk jenis sayuran yang banyak mengandung flavonoid. Kandungan utama flavonoid daun singkong adalah rutin yang merupakan glikosida kuersetin dengan disakarida yang terdiri dari glukosa dan shamnosa (Sukrasno dkk, 2007).

3.1. Flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolik sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆. Berbagai jenis senyawa, kandungan dan aktivitas antioksidatif flavonoid sebagai salah satu kelompok antioksidan alami yang terdapat pada sereal, sayur-

sayuran dan buah, telah banyak dipublikasikan. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Redha, 2010).

Senyawa flavonoid termasuk kedalam senyawa fenol yang merupakan benzena tersubstitusi dengan gugus $-OH$, senyawa flavonoid ini banyak diperoleh dari tumbuhan, zat ini biasanya berwarna merah, ungu, biru, dan kuning. Flavonoid disintesis di dalam tumbuhan (Sulistiono, 2012). Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air. Flavonoid dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap ada dalam lapisan air setelah ekstrak ini dikocok dengan eter minyak bumi. Flavonoid berupa senyawa fenol karena warnanya berubah bila ditambah basa atau ammonia. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran, jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal dalam jaringan tumbuhan (Harborne, 2007). Menurut Sabir (2005) disebutkan bahwa flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri. Adapun menurut Naim (2004), flavonoid memiliki sifat lipofilik sehingga dimungkinkan akan merusak membran sel bakteri.

3.2. Saponin. Saponin adalah suatu glikosida yang ada pada banyak macam tanaman. Saponin berada pada seluruh tanaman dengan konsentrasi tinggi di bagian-bagian tertentu yang dipengaruhi oleh varietas tanaman dan tahap pertumbuhan. Fungsi dalam tumbuh-tumbuhan sebagai bentuk penyimpanan karbohidrat atau merupakan *wasteproduct* dari metabolisme tumbuh-tumbuhan. Kemungkinan lain adalah sebagai pelindung terhadap serangga. Sifat-sifat saponin adalah mempunyai rasa pahit, dalam larutan air membentuk busa yang stabil, menghemolisa eritrosit, membentuk persenyawaan dengan kolesterol dan hidroksi steroid lainnya, sulit untuk dimurnikan dan diidentifikasi, berat molekul relatif tinggi (Lenny, 2006). Saponin sering disebut “deterjen alam”, senyawa ini juga bersifat antibakteri dan antivirus. Meningkatkan sistem kekebalan tubuh,

meningkatkan daya tahan, mengurangi kadar gula darah, mengurangi penggumpalan darah. Saponin dapat menghambat kerja enzim proteolitik pada sistem pencernaan manusia (Beatrice, 2010).

3.3. Tanin Senyawa tanin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dan disintesis oleh tanaman. Tanin tergolong senyawa polifenol yang karakteristiknya dapat membentuk senyawa kompleks. Tanin merupakan senyawa fenol yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri dengan memunculkan denaturasi protein dan menurunkan tegangan permukaan (Sudirman 2014). Tanin memiliki mekanisme penghambatan bakteri dengan membentuk polisakarida yang dapat merusak dinding sel bakteri (Nurhalima *et al.* 2014).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia atau herbal adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan simplisia tidak lebih dari 60⁰ C (Ditjen POM, 2008). Simplisia merupakan bahan awal pembuatan sediaan herbal. Mutu sediaan herbal sangat dipengaruhi oleh mutu simplisia yang digunakan. Simplisia adalah bahan alam yang digunakan sebagai bahan sediaan herbal yang belum mengalami pengolahan apapun dan kecuali dinyatakan lain simplisia merupakan bahan yang telah dikeringkan (Ditjen POM, 2005).

2. Pengumpulan simplisia

Bagian yang digunakan adalah daun. Kadar senyawa aktif dalam suatu simplisia berbeda-beda antara lain tergantung pada bagian yang digunakan, umur tanaman atau bagian tanaman pada saat panen, waktu panen, dan lingkungan tempat tumbuh. Pembentukan senyawa aktif dalam bagian tanaman sangat erat hubungannya dengan waktu panen. Pengambilan bagian daun untuk pembuatan simplisia yaitu dengan cara mengumpulkan daun singkong dan dicuci bersih.

3. Pengeringan simplisia

Pengeringan adalah suatu cara pengawetan atau pengolahan pada bahan dengan cara mengurangi kadar air, sehingga proses pembusukan dapat terhambat.

Pada umumnya, suhu pengeringan adalah antara 40-60⁰C dan hasil yang baik dari proses pengeringan simplisia yang mengandung kadar air 10%. (Sembiring, 2007). Proses pengeringan simplisia menggunakan sinar matahari langsung, pengeringan juga dapat dilakukan dengan menggunakan *oven* pada suhu 40-50⁰C. kelebihan dari alat ini adalah waktu pengeringan lebih singkat yaitu sekitar 8jam, dibandingkan dengan sinar matahari yang membutuhkan waktu lebih dari 1 minggu (Sembiring, 2007).

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

C. Penyarian

1. Definisi ekstrak

Menurut (Depkes RI, 1995), ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut dari suatu serbuk simplisia, sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut (Departemen Kesehatan RI, 2000).

Ekstrak kering adalah sediaan yang berupa serbuk yang dihasilkan dari ekstrak kental yang dikeringkan dengan pengering aerosil (Krisnawati, 2008). Bahan tambahan yang biasanya digunakan dalam sediaan ekstrak kering yaitu Aerosil (SiO₂) atau *Colloidal Silicon Dioxide* merupakan serbuk amorf silika dengan ukuran partikel 15 nm berwarna putih, ringan dan tidak berasa. Aerosil secara luas digunakan dalam sediaan oral maupun topikal yang tidak mengiritasi. Keuntungan aerosil digunakan karena sebagai adsorben karena dapat mengabsorpsi lembab terutama yang berasal dari ekstrak sehingga akan mempermudah pencampuran bahan (Rowe, 2009).

2. Maserasi

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

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dengan golongan utama yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Pemisahan jumlah dan jenisnya menjadi fraksi yang berbeda, mula-mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari dengan pelarut kurang polar, dan yang terakhir dengan pelarut polar (Harborne 2007).

4. Pelarut

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

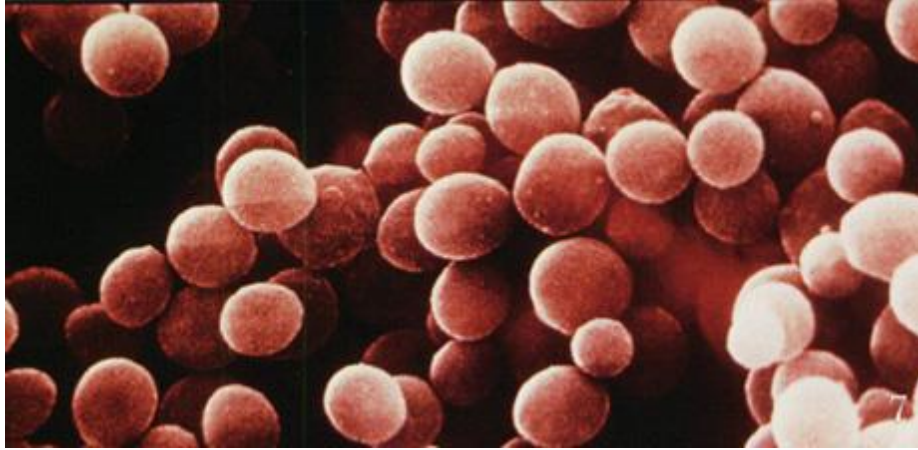
4.1 4.2. *n*-Heksan. Pelarut *n*-heksana merupakan pelarut nonpolar berupa cairan yang jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar dan mempunyai bau seperti eter lemah atau bau seperti petroleum, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa nonpolar, misalnya golongan kandungan kimia minyak atsiri, lemak dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid, dan karotenoid (Tiwari *et al.* 2011).

4.3. Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut semi polar yang berupa cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah. Etil asetat dapat bercampur dengan eter, air, etanol, kloroform, bersifat mudah menguap, mudah terbakar maka penyimpanannya dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas (Harborne 2006). Senyawa yang larut dalam pelarut etil asetat yaitu flavonoid, alkaloid, senyawa-senyawa fenolik seperti feno-fenol, asam fenolat, fenil propanoid, antarkinon dan xanton (Harborne 2006). Senyawa ini merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Senyawa ini berwujud cairan tidak berwarna dan memiliki aroma khas (Tiwari *et al.*2011).

4.4.Air. Air adalah pelarut universal, digunakan untuk ekstraksi tanaman dengan produk aktivitas antimikroba. Ekstrak tumbuh-tumbuhan organik dari pelarut telah memberikan aktivitas antimikroba yang lebih konsisten dibandingkan dengan ekstrak air. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan karena zat aktif ikut tersari sehingga zat lain yang diperlukan mengganggu proses penyarian (Tiwari *et al.*2011).

D. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1. Sistematika *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Gambar No.2. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang Dilihat dari Mikroskop Elektron.

Sumber Todar, 2008

Sistematika bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menurut Garrity *et al* (2004) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Class	: Bacili
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i> (Garitty <i>et al.</i> 2004).

2. Morfologi dan Identifikasi

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif, bentuk bola, berdiameter 0,5-1,5 mikro meter tersusun dalam kelompok-kelompok tidak teratur, satu-satu atau berpasangan, tidak bergerak, dinding sel mengandung dua komponen atau peptidoglikon dan asam metabolit aerob dan anaerob, biasanya peka terhadap panas, terutama ditemukan pada kulit dan selaput lender (Jawetz *et al.*2012).

Cara untuk mengidentifikasi *Staphylococcus aureus* adalah dengan mengisolasi sampel pada medium *Vogel Johnson Agar* (VJA). Koloni yang tumbuh pada medium diamati dan dilanjutkan dengan berbagai uji, yaitu

pewarnaan Gram, uji katalase, goresan, dan uji koagulase. Uji tersebut dapat membedakan *Staphylococcus aureus* dengan bakteri coccus lainnya (Iskamto 2009).

3. Patogenesis

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri patogen penting yang berkaitan dengan virulensi toksin, invasif, dan ketahanan terhadap antibiotik. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan terjadinya berbagai jenis infeksi mulai dari infeksi kulit ringan, keracunan makanan sampai dengan infeksi sistemik. Infeksi yang terjadi misalnya keracunan makanan karena *Staphylococcus*, salah satu jenis faktor virulensi yaitu *Staphylococcus enterotoxin* (Ses). Gejala keracunan makanan akibat *Staphylococcus aureus* adalah kram perut, muntah-muntah, yang kadang diikuti oleh diare (Jawetz *et al.* 2012).

Staphylococcus aureus cenderung menghasilkan koagulase dan pigmen kuning bersifat hemolitik dan meragikan manitol. *Staphylococcus aureus* menetap pada folikel rambut, atau abses. Biasanya terdapat suatu reaksi inflamasi hebat, mengalami supurasi sentral, dan dapat sembuh dengan cepat jika didrainase. Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat juga kontaminasi langsung suatu luka, misalnya infeksi luka pasca bedah atau infeksi sesudah trauma (osteomielitis kronis setelah fraktur terbuka, meningitis sesudah fraktur tulang tengkorak) (Jawetz *et al.* 2012).

E. Media

Media adalah tempat bagi jaringan 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, media padat, dan media 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 tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi (Suriawiria, 2005)

F. Sterilisasi

Sterilisasi adalah tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Alat dan bahan dikatakan steril apabila terbebas dari mikroba. Metode yang digunakan untuk mendapatkan sterilitas pada sediaan farmasi sangat ditentukan oleh sifat sediaan dan zat aktif yang dikandungnya (Suriawiria 2005).

Menurut *The European Pharmacopela* sterilisasi terbagi atas 5 macam yaitu, *steam sterilization* (dipanaskan di autoklaf), *dry heat*, *ionizing radiation*, *gas sterilization*, dan *filtration*. Sinar UV, merebus dan menggunakan formaldehid dapat digunakan untuk situasi tertentu (Denyer *et al.* 2004).

Sterilisasi dengan pemanasan dapat dilakukan pada suhu 160°C-180°C (*dry*) dan 121°C-134°C (*moist*). Pemanasan dengan autoklaf dapat menghancurkan enzim dan zat yang penting bagi pertumbuhan mikroorganisme sehingga mikroorganisme akan mati. Sterilisasi ini tidak dapat digunakan untuk benda-benda yang tidak tahan panas. Pemanasan kering (*dry heat sterilization*) digunakan untuk peralatan yang terbuat dari kaca, logam, dan serbuk yang termotabil, dilakukan pada suhu yang mencapai 250°C. Pemanasan kering tidak dapat digunakan pada benda yang termolabil (Denyer 2004).

Media yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan oven pada suhu 170°C-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin (Denyer 2004).

G. Diare

Penyakit diare adalah frekuensi Buang Air Besar (BAB) yang abnormal akibat kondisi ketidakseimbangan absorpsi air, sekresi air dan elektrolit dengan feses yang tidak berbentuk atau cair yang frekuensinya lebih dari tiga kali selama 24 jam. Frekuensi dan konsistensi feses bervariasi antar individu. Mekanisme kerja terjadinya diare infeksi meliputi penempelan bakteri pada sel epitel dengan atau tanpa kerusakan mukosa, invasi mukosa, dan produksi enterotoksin atau sitotoksin (Cielsa & Guerrant, 2003). Beberapa hal yang dapat menyebabkan diare termasuk bakteri *Salmonella thypi*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli*, virus *Rotavirus*, *Norovirus*, parasit *Cryptosporidium*, *Giardia*, racun bakteri dari *Staphylococcus* dan beberapa senyawa seperti laksatif, antasida yang mengandung magnesium, prostaglandin dan obat antiinflamasi non steroid (Sukandar *et al.* 2013).

H. Kotrimoksazol

Kotrimoksazol dalam penelitian ini digunakan sebagai pembanding (kontrol positif) karena memiliki spektrum yang luas sebagai antibakteri dan memiliki frekuensi terjadinya resistensi yang lebih rendah. Kotrimoksazol merupakan kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol digunakan dalam bentuk kombinasi karena sifatnya sinergistik. Trimetoprim dan sulfametoksazol menghambat reaksi enzimatis obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba. Spektrum antibakteri trimetoprim sama dengan sulfametoksazol. *Escherichia coli* spesies merupakan salah satu mikroba yang peka terhadap kotrimoksazol. Mekanisme antibakterinya berdasar atas kerjanya pada tahap yang berurutan dalam reaksi enzimatis 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). Keuntungan penting lain dari kombinasi ini adalah timbulnya resistensi lebih lambat daripada komponen-komponennya sendiri. Hal ini adalah jelas, karena bakteri yang menjadi resistensi untuk satu komponen masih dapat dimusnahkan oleh yang lain (Tjay & Rahardja 2002).

I. Mekanisme Kerja Antibakteri

1. Definisi

Antibakteri adalah senyawa atau zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Dalam penggolongannya antibakteri dikenal dengan antiseptik dan antibiotik. Daya kerja antibiotik yaitu tidak membedakan antara mikroorganisme dan jaringan tubuh. Sedangkan antiseptik adalah zat-zat kimia yang dihasilkan oleh bakteri dan fungi, yang memiliki khasiat mematikan atau menghambat pertumbuhan kuman (Rostinawati, 2009).

Berdasarkan daya menghambat atau membunuhnya, antibakteri dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu berspektrum sempit (*Narrow spectrum*) dan berspektrum luas (*Broad spectrum*). Antibakteri yang berspektrum sempit yaitu antibakteri hanya dapat bekerja terhadap bakteri tertentu saja, misalnya hanya terhadap bakteri Gram positif saja atau Gram negatif saja. Antibakteri yang berspektrum luas dapat bekerja dengan baik pada bakteri Gram negatif maupun Gram positif (Taloro, 2008).

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai zat antiproliferasi dan ada yang bersifat membunuh bakteri yang dikenal sebagai zat bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) (Ganiswara, 2007).

2. Mekanisme kerja antibakteri

Mekanisme kerja antibakteri merupakan peristiwa penghambatan suatu proses oleh senyawa antibakteri. Berdasarkan mekanisme kerjanya antibiotik dibagi menjadi 5 kelompok.

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

2.2. Menghambat sintesis dinding sel bakteri. Mekanisme kerusakan dinding sel dapat disebabkan oleh adanya akumulasi komponen lipofilik yang terdapat pada dinding sel atau membran sel sehingga menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel. Dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikoprotein) (Ganiswara, 2007) Mekanismenya yaitu dengan merusak lapisan peptidoglikan dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri menyebabkan terjadinya lisis. (Radji, 2002).

2.3. Mengganggu permeabilitas 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 osmotik dalam sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis yang merupakan dasar efek bakterisidal pada bakteri yang peka (Maryuni, 2008). Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya komponen dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain (Ganiswara, 1995). Beberapa jenis antibakteri dapat mengganggu membran sel sehingga mempengaruhi kehidupan sel bakteri, antara lain polimiksi, nistatin, golongan makrolida, dan poliena (misal amfoterin B) (Radji, 2002).

2.4. Menghambat sintesis protein sel bakteri. Hidup suatu sel tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Suatu kondisi atau substansi yang mengubah keadaan ini, yaitu mendenaturasikan protein dan asam-asam nukleat dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu tinggi dan konsentrasi pekat beberapa zat kimia dapat

mengakibatkan koagulasi irreversibel komponen-komponen seluler yang vital ini (Maryuni, 2008). Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu mekanisme kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein yang abnormal dan fungsional bagi sel bakteri (Ganiswara, 1995). Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini antara lain aktinomisin, rifampisin, streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, klindamisin, dan gentamisin (Radji, 2002).

2.5. Menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri. Menjelaskan bahwa suatu senyawa yang bersifat antimikroba dapat mengganggu pembentukan asam nukleat sehingga transfer informasi genetik akan terganggu. Hal ini disebabkan senyawa antimikroba menghambat aktivitas enzim RNA polimerase dan DNA polimerase yang selanjutnya dapat menginaktivasi atau merusak materi genetik sehingga mengganggu proses pembelahan sel untuk pembiakan. Antibakteri yang memiliki mekanisme kerja ini pada umumnya bersifat toksik kurang selektif, karena antibakteri ini bersifat sitotoksik yang masih dapat diterima sebagai antibakteri (Ganiswara, 1995). Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini antara lain asam nalidiksat dan golongan kuinolon (Radji, 2002)

J. 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 metode 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 faktor kimia, faktor antar obat dan organisme (Jawetz *et al*,2012).

Keuntungan metode difusi adalah dapat dengan mudah menentukan potensi antibakteri mengukur diameter zona radikal dan zona iradikal dibanding dengan metode dilusi yang pengamatannya sulit karena warna ekstrak sangat berpengaruh. Zona radikal adalah suatu daerah disekitar sumuran yang sama sekali tidak terlihat pertumbuhan bakteri, sedangkan zona iradikal adalah daerah disekitar sumuran yang pertumbuhan bakterinya dihambat oleh zat antimikroba tetapi tidak dimatikan. Kekurangan metode ini adalah aktivitas antibakterinya dapat dipengaruhi oleh tebal tipisnya medium dan faktor difusibilitas obat karena suspensi bakteri tidak tersebar merata seperti metode dilusi (Jawetz *et al*. 1986).

2. Metode dilusi

Metode dilusi 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 ini adalah mempersulit pengamatan, membutuhkan alat yang banyak dan tidak praktis (Jawetz *et al*,2012).

K. Landasan Teori

Banyak flora di Indonesia yang dikategorikan sebagai tumbuhan obat telah dimanfaatkan secara tradisional oleh nenek moyang kita sejak berabad-abad yang lalu. Kini kegunaan dan permintaan terhadap obat tradisional semakin bertambah sehingga penelitian ke arah obat-obatan tradisional semakin meningkat, yang disebabkan karena efek samping yang tradisional yang lebih kecil daripada obat modern (Hariana, 2004). Penelitian sebelumnya, telah dilakukan evaluasi

potensial antibakteri dari ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dimaserasi menggunakan pelarut etanol, menggunakan metode difusi agar dengan cara sumuran. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa diameter zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 0,01325% dari ekstrak etanol adalah 9,32 mm (Cik mutia dkk, 2016).

Daun singkong manfaatnya sebagai obat antara lain untuk anti kanker, mencegah konstipasi dan anemia, serta meningkatkan daya tahan tubuh. Kandungan vitamin dan mineralnya rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan sayuran daun lain. Vitamin A dan C pada daun singkong berperan sebagai antioksidan yang mencegah proses penuaan dan meningkatkan daya tahan tubuh terhadap serangan penyakit. Kandungan kalsium yang tinggi sangat baik untuk mencegah penyakit tulang seperti rematik dan asam urat (Adi, 2006).

Staphylococcus aureus merupakan bakteri penyebab diare akut yang di sebabkan karena toksin *Staphylococcus* yang masuk kedalam makanan, karena makanan yang tidak tepat cara pengawetannya (Jawetz, 2007). Walaupun presentase diare sebagai penyebab kematian pada anak di Indonesia dan negara – negara berkembang lainnya cenderung menurun tetapi Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memprediksikan pada tahun 2025 masih akan terjadi 5 juta kematian pada anak usia kurang dari umur lima tahun akibat diare (Nailul, 2013).

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawanya yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (Tiwari *et al.*2011).

Pelarut etanol adalah pelarut ideal yang sering digunakan adalah alkohol canmpurannya dengan air yang merupakan pelarut pengekstraksi yang mempunyai *ekstraksi power* yang terbaik untuk hampir semua senyawa yang mempunyai berat molekul rendah seperti alkaloid, saponin, dan flavonoid (Arifianti *et al.*2014). Pelarut n-heksan merupakan salah satu hasil dari penyulingan minyak tanah kasar. Merupakan pelarut yang baik untuk lemak-lemak dan minyak-minyak. (Syamsuni, 2007). Etil asetat merupakan pelarut semi

polar yang berupa cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah. Etil asetat dapat bercampur dengan eter, air, etanol, kloroform, bersifat mudah menguap, mudah terbakar maka penyimpanannya dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas (Harborne 2006). Senyawa yang larut dalam pelarut etil asetat yaitu flavonoid, alkaloid, senyawa-senyawa fenolik seperti fenol-fenol, asam fenolat, fenil propanoid, antarkinon dan xanton (Harborne 2006). Air adalah pelarut universal, digunakan untuk ekstraksi tanaman dengan produk aktivitas antimikroba. Ekstrak tumbuh-tumbuhan organik dari pelarut telah memberikan aktivitas antimikroba yang lebih konsisten dibandingkan dengan ekstrak air. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan karena zat aktif ikut tersari sehingga zat lain yang diperlukan mengganggu proses penyarian (Tiwari *et al.* 2011).

Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah metode difusi dan dilusi. 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 (Jawetz *et al.*, 2012). Sebagai kontrol positif dalam penelitian ini dapat digunakan kotrimoksazole merupakan antibiotik kombinasi sulfametoksazol dan trimetoprin dengan perbandingan 5:1. Kombinasi sulfametoksazole dan trimetoprin menunjukkan aksi sinergis karena dapat menghambat biosintesis asam hidrofolat melalui dua jalur (Siswandoyo, dan Soekardjo 2008)

L. Hipotesis

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

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

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

Ketiga, dapat menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi paling aktif ekstrak daun singkong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang diperoleh dari Magetan, Jawa Timur.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz.) yang diperoleh dari Magetan, Jawa Timur. Dipilih daun yang masih segar dan bebas dari hama. Daun diambil secara acak dari pangkal sampai ujung batang.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan air.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun singkong terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dengan berbagai konsentrasi yang diperoleh dengan metode maserasi dan fraksinasi.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian dan variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan

bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang dipengaruhi oleh fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun singkong yang dilihat dari pertumbuhannya pada media uji.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel terikat selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kondisi laboratorium (meliputi kondisi inkubasi, alat dan bahan yang digunakan harus steril), dan media yang digunakan dalam penelitian harus steril.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang diperoleh dari Magetan, Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun singkong adalah daun yang dikeringkandengan oven pada suhu 40⁰C, kemudian diserbuk sampai menjadi serbuk halus yang diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun singkong adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% sebagai cairan penyari lalu dipekatkan dengan *vacum evaporator* sampai bebas etanol dan dilanjutkan fraksinasi dengan air sebagai pelarut polar, etil asetat sebagai pelarut semipolar, dan *n*-heksan sebagai pelarut nonpolar

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah hasil fraksinasi dari ekstrak maserasi daun singkong dengan fraksinasi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksan sebagai pelarut non polar, kemudian dipekatkan dengan oven sehingga didapat fraksi *n*-heksan.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksinasi dari residu *n*-heksan dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar, kemudian dipekatkan dengan oven sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, fraksi air dari daun singkong adalah hasil fraksinasi dari ekstrak maserasi daun singkong dengan menggunakan air sebagai pelarut polar, kemudian dipekatkan dalam waterbath.

Ketujuh, bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* yang diambil dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, metode difusi dengan menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air yaitu dengan cakram disk. Kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif adalah kotrimoksazole.

Kesembilan, aktivitas antibakteri adalah aktivitas antibakteri yang ditentukan dengan metode dilusi untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19% dan 0,09%. Kontrol negatif adalah ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan kotrimoksazol dan kontrol positif adalah suspensi bakteri.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang diperoleh dari Magetan, Jawa Timur.

1.2. Bahan Kimia. Bahan kimia yang digunakan antara lain pelarut etanol 70%, pelarut *n*-heksan, pelarut etil asetat, aquadest, larutan standart MC Farland 0,5, DMSO 5%, FeCl₃, HCl, asam sulfat pekat, serbuk Mg, Kristal violet (Gram A), *Lugol iodine* (Gram B), Alkohol-Aseton (Gram C), Safranin (Gram D), H₂O₂, dan Plasma darah.

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

1.4. Media. Media yang digunakan dalam penelitian adalah *Nutrien Agar*, *Brain Heart Infusion* (BHI), *Muller Hinton Agar* (MHA), *Vogel Johnson Agar* (VJA).

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mesin penggiling untuk membuat serbuk, alat maserasi berupa botol mulut lebar warna coklat, oven, gelas

ukur, pembakar spirtus, kaca objek, penggaris, kaki tiga, kertas saring, selang, corong penyaring, rotary evaporator, timbangan analitik, erlenmeyer, batang pengaduk, tabung reaksi, cawan petri, inkas, jarum ose, pinset, vial, spuit, labu alas bulat, rak tabung, penggaris, mikroskop, moisture balance, pipet ukur, corong pisah, autoklaf, inkubator.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah determinasi dan deskripsi daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz). Determinasi ini dilakukan di Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Determinasi dan deskripsi ini bertujuan untuk menetapkan keberadaan yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi baik secara makroskopi maupun mikroskopi tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap kepastakaan yang dibuktikan di Laboratorium.

2. Pembuatan ekstrak simplisia

Penyiapan bahan untuk pembuatan ekstrak daun singkong dikumpulkan kemudian dicuci dengan air mengalir sampai bersih dari kotoran kemudian dilakukan pengeringan dengan oven pada suhu 40°C. Pengeringan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga dapat mencegah pertumbuhan jamur, bakteri, dan perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu serta memudahkan dalam proses penyerbukan. Setelah kering diserbuk dengan mesin penggiling kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga didapatkan serbuk daun singkong yang mempunyai derajat kehalusan yang homogen. Tujuan penyerbukan ini, agar luas permukaan partikel bahan yang kontak dengan larutan penyaring dapat diperluas sehingga penyaringannya efektif.

3. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun singkong

Penetapan kadar air daun singkong dilakukan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Caranya temperatur diatur yaitu pada suhu 95⁰C serta waktu pengeringan secara manual yaitu selama 15 menit kemudian dimasukkan pada neraca timbang dengan skala 0,00 maka sampel serbuk daun singkong 2 gram dimasukkan. Kemudian ditunggu sampai alat *Moisture Balance* berbobot konstan

yang dimana menandakan hasil analisa telah selesai. Kadar air akan memenuhi syarat apabila kadar air suatu serbuk simplisia tidak lebih dari 10 %.

4. Pembuatan ekstrak etanolik daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz)

Pembuatan ekstrak dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Serbuk daun singkong sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat, dengan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 3.750 ml. Ekstraksi dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojog berulang-ulang. Maserat yang didapatkan selama 5 hari diperas dengan kain flanel dan disaring. Residu kemudian ditambahkan etanol 1.250 ml dimasukkan ke dalam botol dengan sekali diaduk dan dibiarkan selama 2 hari. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental.

5. Tes bebas etanol daun singkong

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

6. Fraksinasi

Fraksinasi dari ekstrak etanol daun singkong dilakukan dengan cara menimbang 10 gram ekstrak etanol hasil maserasi di dalam beaker glass kemudian dilarutkan dengan pelarut air 75 ml, difraksi dengan pelarut *n*-heksan sebanyak 3 kali dengan masing-masing 75 ml, fraksi *n*-heksan yang didapat diuapkan. Residu yang didapat dari fraksi *n*-heksan dilanjutkan fraksinasi 3 kali dengan pelarut etil asetat masing-masing 75 ml. Hasil yang didapat adalah fraksi etil asetat dan fraksi air kemudian diuapkan sampai pekat lalu ditimbang.

7. Identifikasi kandungan kimia serbuk ekstrak daun singkong

Identifikasi kandungan kimia dilakukan terhadap senyawa flavonoid, saponin, triterpenoid, alkaloid, dan tanin dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

7.1. Identifikasi Flavonoid. Sampel sebanyak $\pm 0,5$ g dicampurkan dengan aquadestilata. Setelah itu, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 0,5 mg bubuk Mg dan ditambahkan 1 ml HCl pekat dan ambil alkohol. Dicampur dan dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditandai dengan warna merah kekuningan atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah 2014).

7.2. Identifikasi Saponin. Sampel sebanyak $\pm 0,5$ g ditambahkan aquadestilata 2ml, kemudian dipanaskan selama 2 sampai 3 menit. Setelah dipanaskan tunggu sampai dingin lalu kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil dan setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang menandakan adanya kandungan saponin (Alamsyah, 2014).

7.3. Identifikasi tanin. Sampel sebanyak $\pm 0,5$ g dididihkan dalam 2 ml air lalu disaring. Filtrat ditambahkan FeCl₃ 1% vortex hingga mengalami perubahan warna. Sampel dinyatakan positif apabila mengalami perubahan warna hijau kehitaman (Alamsyah, 2014).

8. Sterilisasi

Sterilisasi inkas menggunakan formalin, media agar yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121⁰ C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan menggunakan autoklaf dan yang tidak ada ukurannya disterilkan dengan oven pada suhu 170-180⁰ C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung (Suriawiria, 2005).

9. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

9.1. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Tujuan dari pewarnaan Gram adalah untuk memastikan bakteri tersebut termasuk dalam golongan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Gram negatif didapatkan bila sel bakteri tersebut berwarna merah, bentuk bulat berarti positif termasuk dalam golongan *Staphylococcus aureus*. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian tetes Kristal Violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada kedua preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Cuci dengan aquadest mengalir

kemudian tetesi mordant (*Lugol, s iodine*/Gram B), diamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C (alkohol-aseton) dan diamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian keringkan preparat, preparat ditetesi Safranin (Gram D) tunggu kurang lebih 1menit dicuci dengan aquadest mengalir kemudian keringkan dengan kertas tissue yang ditempelkan di sisi ulasan lalu didiamkan sampai mengering di udara, amati dibawah mikroskop. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dinyatakan positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati dibawah mikroskop. (Volk dan Wheller 2008).

9.2. Identifikasi bakteri secara goresan. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 digoreskan pada medium *Vogel Jhonson Agar* (VJA) yang ditambah kalium tellurit 1% kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Positif bila koloni yang dihasilkan berwarna hitam, warna medium di sekitar koloni kuning (Hadioetomo 2005).

9.3. Tes katalase.Bakteri uji ditanam pada medium Nutrien cair dengan volume 0,5 ml lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C ditambahkan 2–3 tetes H₂O₂ 3%. Hasil positif ditandai adanya gelembung udara sebab *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mempunyai enzim katalase. Penambahan H₂O₂ akan terurai menjadi H₂O dan O₂. Hal ini ditandai dengan timbulnya gelembung udara (Jawetz *et al.* 2001).

9.4. Tes koagulase.Koagulase merupakan suatu enzim yang dapat mengubah fibriogen menjadi fibrin, kemudian mampu mengumpulkan plasma. Hampir semua strain *Staphylococcus aureus*ATCC 25923 menghasilkan enzim koagulase (Todar, 2008).Uji koagulase dilakukan dengan cara menginokulasikan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kedalam medium BHI sebanyak 2ml kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Inokulum tersebut dipindahkan sejumlah 0,2-0,3 ml kedalam tabung reaksi yang sudah disterilkan kemudian ditambahkan 0,5 ml koagulase plasma kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu 37⁰C. Diamati tiap jam sampai empat jam pertama dan dilanjutkan sampai 24jam. Hal ini dimaksudkan untuk melihat atau mengecek

koagulan yang terbentuk. Koagulan yang terbentuk secara padat atau solid serta tidak jatuh apabila tabung dibalik dinyatakan positif bahwa bakteri tersebut memang *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

10. Pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diambil dari suatu biakan murni pada media *Nutrien Agar* (NA) diambil kurang lebih 2 ose dan dibuat suspensi dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan MC Farland 0,5 kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah sel bakteri (Bonang, 2002).

11. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif *n*-heksan, etil asetat dan air daun singkong secara difusi.

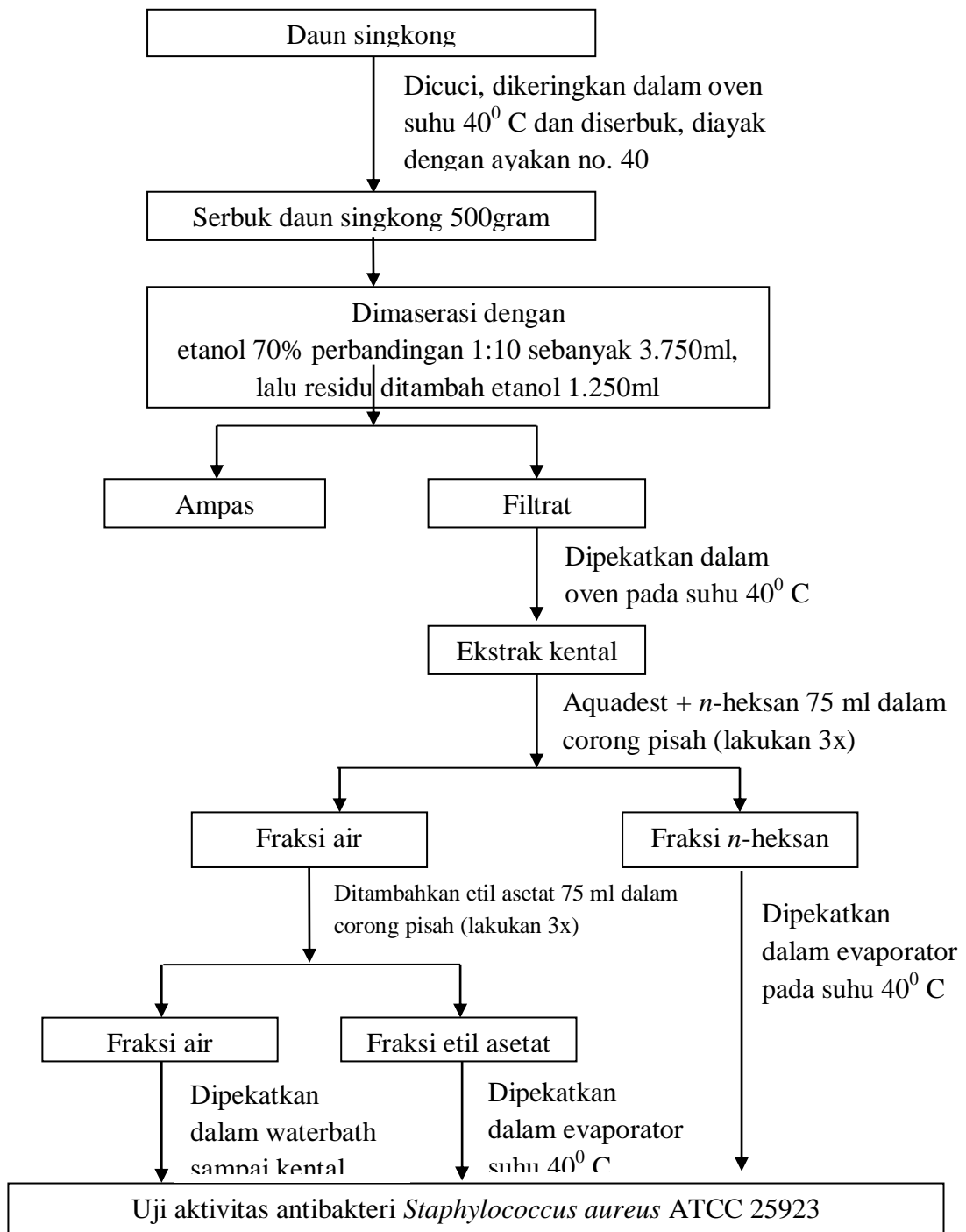
Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Ekstrak etanol daun singkong yang telah difraksinasi menggunakan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air masing-masing dibuat pada konsentrasi 12,5%, 25%, dan 50%. Metode difusi menggunakan 3 cawan petri steril yang telah diisi dengan media MHA sebanyak 30 ml. Secara aseptis pada cawan petri digoresi suspensi bakteri menggunakan lidi steril dengan metode perataan (*Spread plate Method*) dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Uji ini menggunakan metode cakram disk. Cakram berukuran 6 mm dicelupkan masing-masing dalam ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, kotrimoksazol sebagai kontrol positif, dan pelarut DMSO 5% sebagai kontrol negatif pada 3 seri konsentrasi fraksi dan direndam selama 2 jam. Setelah itu cakram diletakkan atau ditempelkan pada media MHA dengan menggunakan pinset pada tiap cawan. Kemudian cawan diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya, setelah itu diukur diameter zona hambat di sekitar cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar cakram menandakan bahwa kandungan kimia daun singkong memiliki daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

12. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif *n*-heksan,etil asetat, dan air daun singkong secara dilusi.

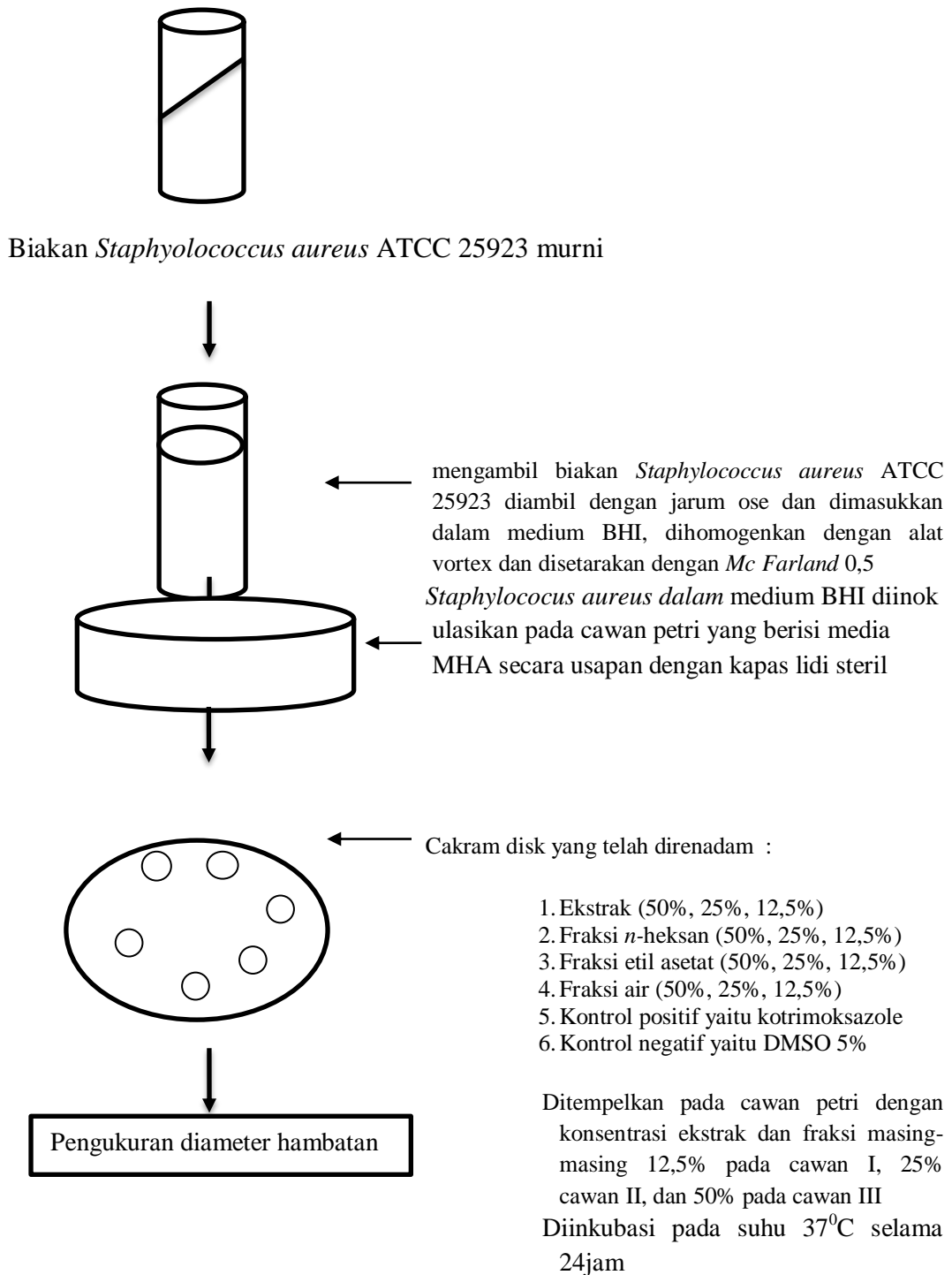
Hasil ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun singkong yang diperoleh diuji secara mikrobiologi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pengujian daya antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi dengan metode dilusi untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 10 tabung steril. Masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa seri konsentrasi yang berbeda yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%. Suspensi bakteri dalam medium BHI dimasukkan ke dalam masing-masing tabung uji. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam, lalu diamati kekeruhannya. Menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu batas terendah tabung media yang jernih atau yang memberikan hasil negatif (-), kemudian menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan cara tabung media yang jernih diinokulasikan secara goresan pada media VJA untuk masing-masing bakteri uji, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Mengamati ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Konsentrasi bunuh minimum ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

E. Analisis hasil

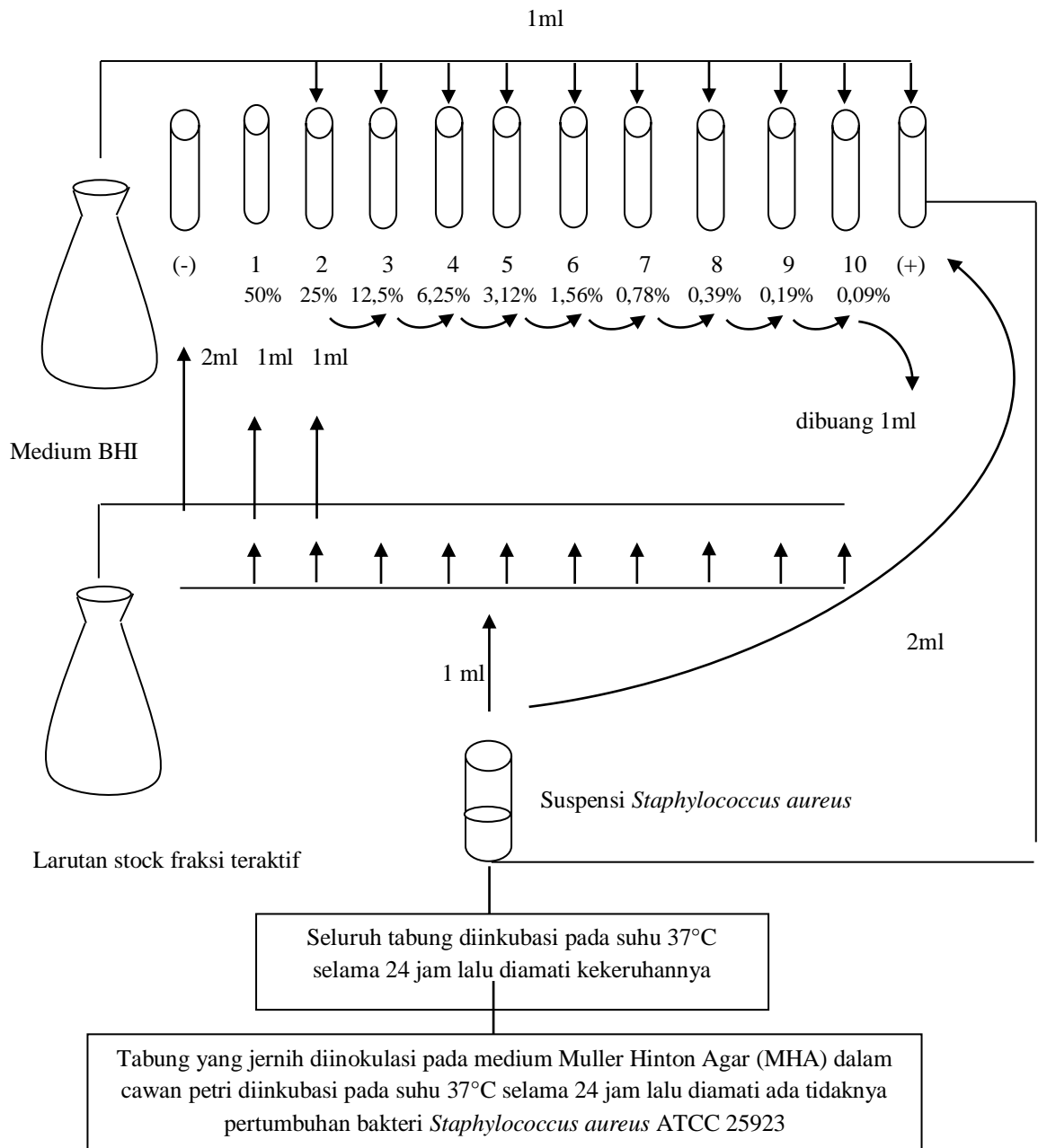
Hasil uji aktivitas bakteri ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dianalisis berdasarkan nilai zona hambat yang terbentuk menggunakan metode difusi. Hasil data yang diperoleh dianalisis menggunakan statistik metode One Way Anova.



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanolik dan fraksinasi daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz).



Gambar 4. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun singkong(*Manihot esculenta* Crantz.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 dengan metode difusi



Gambar 5. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 dengan metode dilusi.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Hasil determinasi tanaman daun singkong

1.1. Hasil determinasi tanaman daun singkong. Determinasi tanaman pada penelitian ini bertujuan untuk menetapkan keberadaan yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi baik secara makroskopi maupun mikroskopi tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap kepustakaan yang dibuktikan di laboratorium. Determinasi tanaman daun singkong dilakukan di unit Laboratorium Program Studi Biologi Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Berdasarkan hasil determinasi tersebut dinyatakan bahwa tanaman yang diteliti adalah tanaman *Manihot esculenta* Crantz. Dengan hasil determinasi sebagai berikut: 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-73a. Familia 99.Euphorbiaceae 1b-3b-4b-6b-73b-80b-81b-84b-85a-86b-87b-88a-89a. *Manihot* 1a. *Manihot esculenta* Crantz. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran .

1.2. Hasil deskripsi tanaman daun singkong. Daun singkong termasuk tanaman habistus : perdu, menahun, tumbuh tegak, bergetah, tinggi 2-7 m. Akar: tunggang, kalau diperbanyak dengan stek akan membentuk akar serabut yang kemudian berkembang menjadi umbi akar, umbi akar besar, panjang, kulit berwarna coklat suram, daging umbi berwarna putih hingga kuning. Batang: bulat, berkayu, sedikit bercabang atau tidak bercabang sama sekali, di bagian tengah terdapat jaringan gabus, di permukaan batang terdapat bekas dudukan tangkai daun yang bertonjolan, licin dan gundul, putih kotor. Daun : tunggal, tersusun berseling, bentuk helaian daun bulat, diameter 5-20cm, pangkal tumpul hingga membulat, tepi berbagi menjari dengan 5-9 cangap, cangapnya berbentuk bulat telur memanjang hingga menggaris-lanset, ujung cangap runcing, lebar 1-6cm, ujung helaian daun membulat, pertulangan menjari, permukaan atas hijau tua dan permukaan bawah hijau muda, licin dan gundul; tangkai daun bulat, hijau hingga hijau kemerahan, licin dan gundul, panjang 6-35cm; daun penumpu sepasang,

dekat pangkal tangkai daun, berlepasan, ujungnya rata, mudah rontok. Bunga : majemuk tipe tandan, 3-5 tandan berkumpul diujung batang, pada bagian pangkal terdapat bunga betina, di bagian atas terdapat bunga jantan, panjang tenda bunga 1 cm. Bunga jantan : panjang tangkai bunga 4-6 mm, tenda bunga berbentuk lonceng, bertaju 5, benangsari 10, berseling panjang dan pendek, tertancap di sekitar penebalan dasar bunga yang kuning dan berlekuk. Bunga betina : panjang tangkai bunga 1.5-2.5 cm, kelopak bunga lebih besar daripada bunga jantan, tenda bunga berbagi 5, bakal buah dikelilingi oleh tonjolan penebalan dasar bunga yang berbentuk cincin, kuning, tangkai putik bersatu, sangat pendek, dengan kepala putik yang lebar berwarna kuning mentega dan berlekuk banyak. Buah : berbentuk seperti bola atau telur, dengan 6 papan yang membujur seperti sayap, hijau tapi berubah menjadi coklat ketika masak. Biji : kecil, terdapat alat tambahan yang berlekuk pada pangkal biji, coklat. Hasil deskripsi dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Hasil Pengeringan daun singkong

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun singkong yang diambil secara acak dari tangkai daun yang masih segar dan hijau yang diperoleh dari daerah Magetan, Jawa Timur pada bulan Februari 2018.

Daun singkong yang dipanen dilakukan pembersihan untuk menghilangkan kotoran pada daun singkong. Selanjutnya dilakukan pengeringan dengan oven pada suhu 40⁰C selama 48jam.

Tabel 1. Hasil perhitungan rendemen simplisia daun singkong

Bobot daun singkong basah (g)	Bobot daun singkong kering (g)	Rendemen (% b/b)
11.000	1730	15,72

Berdasarkan data yang diperoleh berat kering serbuk daun singkong sebesar 1730 gram dari berat basah sebesar 11kg, dan diperoleh rendemen serbuk kering terhadap berat serbuk basah sebesar 15,72% b/b. Hasil dapat dilihat pada Lampiran 10.

Pengeringan adalah suatu metode yang dimaksudkan untuk mengurangi kadar air dari suatu bahan dengan menggunakan energi panas. Pengeringan dapat memberikan beberapa keuntungan antara lain, mencegah pertumbuhan jamur,

mengurangi kadar air, mencegah proses atau reaksi enzimatika yang dapat menurunkan mutu, memperpanjang masa simpan, dan mengurangi penurunan mutu sebelum diolah lebih lanjut, memudahkan dalam proses pengangkatan, dan mutu hasil lebih baik.

Daun singkong yang telah dikeringkan kemudian diserbuk dengan menggunakan mesin penyerbuk yaitu blender, kemudian diayak sampai derajat halus menggunakan ayakan no 40. Penyerbukan bertujuan untuk memperkecil ukuran serbuk, memperluas permukaan partikel sehingga pengeskraksian dapat berlangsung efektif (Depkes RI 2008).

3. Hasil Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan serbuk simplisia dilakukan untuk mengetahui kelembaban dalam serbuk simplisia. Susut pengeringan mewakili kandungan senyawa yang menguap. Kelembaban tidak boleh lebih dari 10% untuk mengurangi tercemarnya ekstrak oleh mikroba. Kelembaban yang terlalu tinggi akan memudahkan pertumbuhan jamur dan bakteri serta pertumbuhan kimia yang dapat merusak simplisia (Depkes RI 1995). Penetapan susut pengeringan serbuk simplisia menggunakan alat *moisture balance*. Prinsip kerja alat *moisture balance* adalah terjadinya pemanasan serbuk kemudian terjadi penguapan sampai bobot serbuk menjadi tetap. Hasil penetapan kadar susut pengeringan bobot simplisia dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar susut pengeringan serbuk daun singkong.

Berat awal (g)	Susut pengeringan (%)
2,000	7,3
2,000	7,6
2,000	7,7
Rata-rata ± SD	7,53±0,208

Penetapan presentase kadar susut pengeringan bobot simplisia didapatkan kadar susut pengeringan serbuk daun singkong kurang dari 10% yaitu 7,53 %.

4. Hasil Pembuatan ekstrak daun singkong

Tabel 3. Rendemen ekstrak etanol daun singkong

Serbuk daun singkong (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%)
500	105	21%

Hasil maserasi serbuk daun singkong 500 g didapatkan ekstrak kental seberat 105 gram dan rendemen sebesar 21 %b/b. hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 11.

5. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun singkong

Ekstrak daun singkong hasil maserasi dilakukan uji bebas etanol dengan melakukan esterifikasi alkohol.

Tabel 4. Hasil pemeriksaan bebas etanol ekstrak daun singkong

Tes bebas etanol	Pustaka (Kurniawati 2015)	Hasil
Ekstrak secukupnya + H ₂ SO ₄ + CH ₃ COOH dipanaskan	uji positif bebas etanol jika tidak tercium bau ester yang khas dari etanol.	Tidak ada bau ester yang khas

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak daun singkong telah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 70%. Hasil ditandai dengan tidak terdapatnya bau ester yang khas dari etanol.

6. Hasil fraksinasi ekstrak daun singkong

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu golongan utama, pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolarannya (Harbonne 2006). Kelarutan suatu komponen tergantung pada derajat kepolarannya, hukum “like dissolve like” menyatakan bahwa senyawa kimia tertentu hanya larut pada pelarut yang mampu melarutkan senyawa tersebut. Fraksinasi dilakukan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan air. Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang 10 gram ekstrak etanol daun singkong dari hasil maserasi kemudian difraksinasi dengan pengulangan 3 kali dan fraksinasi dilakukan sebanyak 6 kali, sehingga total penggunaan ekstrak untuk fraksinasi adalah sebesar 60 gram. Pengulangan ini dimaksudkan untuk meningkatkan efisiensi dari proses penyarian senyawa. Penyarian yang baik diperoleh apabila jumlah ekstraksi yang dilakukan berulang dengan penambahan jumlah pelarut sedikit demi sedikit (Khopar 2003). Hasil rendemen fraksinasi dapat dilihat pada Gambar dan perhitungan pada lampiran 4.

Tabel 5. Hasil rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air

Pelarut	Bobotwadah +fraksi (g)	Bobot wadah kosong (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
<i>n</i> -heksan	155,24	151,03	4,21	14,03
Etil asetat	179,39	178,29	3,96	13,2
Air	150,79	147,12	3,67	33,43

Berdasarkan hasil rendemen pada tabel 5, fraksinasi ekstrak etanol daun singkong menunjukkan kandungan senyawa terlarut dalam fraksi polar lebih banyak dibandingkan senyawa semipolar dan nonpolar. Hasil rendemen yang berbeda dari tiap fraksi berkaitan dengan banyaknya senyawa yang terkandung di dalam daun singkong.

7. Hasil identifikasi kandungan kimia daun singkong

Uji kandungan senyawa kimia merupakan pengujian pendahuluan terhadap ekstrak untuk mengetahui senyawa kimia yang terdapat senyawa kimia yang terdapat di dalam ekstrak sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut. Pengujian kandungan kimia dilakukan dengan menggunakan pereaksi warna dengan tabung reaksi, kemudian diamati perubahan yang terjadi, hasil positif akan memberikan tanda yang khas untuk setiap pengujian. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dari daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dapat dilihat pada tabel 6 dan Lampiran7.

Tabel 6. Hasil identifikasi fitokimia secara kualitatif ekstrak daun singkong

Senyawa	Pereaksi	Hasil	Ekstrak	Serbuk	Fraksi etil asetat	Fraksi <i>n</i> - heksan	Fraksi air
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl pekat + alkohol	Larutan kuning kemerahan atau jingga	+	+	+	+	+
Saponin	Air panas + HCl 2N	Ada buih	+	+	+	-	-
Tanin	Air panas + FeCl ₃	Hijau kehitaman	+	+	+	+	+

Keterangan :(+): ada senyawa

(-): tidak ada senyawa

Hasil identifikasi secara kualitatif memberikan kesimpulan bahwa kandungan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak etanolik adalah flavonoid, saponin, dan tanin.

8. Hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

8.1. Hasil identifikasi mikroskopis pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengelompokkan bakteri menjadi 2 yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pewarnaan Gram menggunakan 4 jenis reagen, Gram A (kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordan), Gram C (Etanol: aseton = 1:1), Gram D (cat safranin sebagai cat lawan/ penutup). Bakteri Gram positif akan mempertahankan warna ungu sedangkan bakteri Gram negatif tidak akan mempertahankan warna ungu kristal violet, tetapi zat warna safranin dapat terserap pada dinding sel sehingga pada saat dilihat menggunakan mikroskop akan berwarna merah. Prinsip dari metode ini adalah didasarkan pada perbedaan struktur pada dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal, tersusun oleh sebagian besar peptidoglikan yang dapat mengikat warna dan tidak rusak setelah penambahan Gram C sehingga dapat mempertahankan warna kristal violet. Bakteri Gram negatif berwarna merah karena memiliki dinding sel yang relatif tipis, membran luar dilapisi oleh lipopolisakarida dan tidak dapat mempertahankan zat warna, sehingga pada saat penambahan Gram C warna dari kristal violet luntur dan sewaktu diberi pewarnaan Gram D maka bakteri Gram negatif akan tampak berwarna ungu. Bakteri Gram positif mengandung protein dalam prevalensi lebih rendah dan dinding selnya tebal. Pemberian kristal violet dan iodine, pemberian etanol pada pewarnaan Gram menyebabkan tidak terekstraksinya lipid sehingga memperkecil permeabilitas dinding sel Gram positif. Dinding selnya terdehidrasi dengan perlakuan alkohol, pori-pori mengkerut, daya rembes dinding sel dan membran menurun sehingga pewarnaan safranin tidak masuk sehingga sel berwarna ungu (Jawetz *et al.*2008). Hasil identifikasi dengan pewarnaan Gram dapat dilihat pada Lampiran 6 .

8.2. Hasil metode goresan. Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan pada medium VJA yang sebelumnya telah ditambahkan kalium tellurit 1% dan diinkubasi selama 24jam pada suhu 37⁰C menunjukkan hasil yang positif. VJA mengandung mannitol, tellurite, lithium chlorid yang berperan untuk mengisolasi bakteri yang bersifat koagulase positif. Hasil positif ditandai dengan

koloni berwarna hitam karena *Staphylococcus aureus* memfermentasi manitol menjadi asam yang kemudian mengubah indikator phenol red pada VJA menjadi kuning, adanya lithium chlorid bermanfaat untuk menghambat tumbuhnya bakteri lain (Jawetz *et al.*2008). Hasil identifikasi dengan uji biokimia dapat dilihat pada Lampiran 6.

8.3. Hasil uji katalase. Uji katalase berguna untuk mengidentifikasi kelompok bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase. Dilakukan dengan cara mencampurkan 0,5 ml hidrogen peroksida 3% dengan 1 ose *Staphylococcus aureus*. Hasil pada penelitian positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung udara atau buih yang disebabkan adanya katalase yang dimiliki *Staphylococcus aureus*, H_2O_2 akan terurai menjadi H_2 dan O_2 , hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini menginaktifkan enzim dalam sel. Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob pasti menguraikan bahan tersebut (Lay 1994). Hasil identifikasi dengan uji biokimia dapat dilihat pada Lampiran 6.

8.4. Hasil uji koagulase. Uji koagulase dilakukan dengan cara menyiapkan plasma darah kelinci yang diberi asam sitrat, diencerkan (1:5) ditambah 1 ose biakan bakteri dan selanjutnya diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 24jam. Berdasarkan hasil uji koagulase yang dilakukan diperoleh hasil positif yang dibuktikan dengan dapat mengkoagulasi plasma. Uji koagulase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim koagulase. Koagulase merupakan protein ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* yang dapat digunakan untuk sarana diagnostik (Bruckler *et al.*1994). Hasil identifikasi dengan uji biokimia dapat dilihat pada Lampiran 6.

9. Hasil pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diambil dari suatu biakan murni pada media *Nutrien Agar* (NA) diambil kurang lebih 2 ose dan dibuat suspensi dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan MC Farland 0,5 yang menunjukkan jumlah sel bakteri setara dengan 10^8 CFU/ml, kemudian diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 24 jam. Selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas (Bonang, 2002).

10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksinasi daun singkong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi

Hasil sediaan dari ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan fraksi air daun singkong dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi untuk mengetahui terbentuk atau tidaknya zona bening di sekeliling cakram (disk) yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan larutan uji terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada medium *Muller Hinton Agar* (MHA). Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui mana yang mempunyai daya hambat yang paling baik terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pengujian aktivitas sediaan dari ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun singkong dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan konsentrasi masing-masing 50%, 25%, 12,5% dan kotrimoksazole sebagai kontrol positif serta DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Perhitungan konsentrasi larutan dapat dilihat pada lampiran 12. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 8.

Tabel 7. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksinasi daun singkong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi

Sampel	Konsentrasi(%)	Diameter hambat (mm)			
		Replikasi			Rata-rata(mm) ±SD
		1	2	3	
Ekstrak	50	17	18	17	17,33±0,58
	25	16	16	15	15,66±0,58
	12,5	12	12	11	11,66±0,58
Fraksi <i>n</i> -heksan	50	11	11	11	11,00±0,00
	25	10	10	19	13,00±5,20
	12,5	9	8	7	8,00±1,00
Fraksi etil asetat	50	19	19	20	19,33±0,58
	25	18	17	17	17,33±0,58
	12,5	16	16	15	15,66±0,58
Fraksi air	50	10	10	11	10,33±0,58
	25	9	9	10	9,33±0,58
	12,5	8	8	7	7,66±0,58
Kontrol positif (kotrimoksazole)	25µg	23	22	23	22,66±0,58
Kontrol negatif (DMSO 5%)	5	0	0	0	0±0

Berdasarkan hasil tabel diatas dari pengujian aktivitas antibakteri fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol daun singkong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan adanya daya hambat dibuktikan dengan adanya daerah disekitar disk yang tidak ditumbuhi bakteri, dari tabel diatas menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai daya hambat paling besar terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 karena fraksi etil asetat mampu menarik senyawa flavonoid pada daun singkong tersebut. Perbedaan diameter hambat dikarenakan senyawa yang terdapat dalam ekstrak berbeda-beda tergantung tingkat kepolaran dari fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air. Pada pelarut DMSO 5% tidak ada pertumbuhan bakteri karena DMSO 5% digunakan untuk melarutkan bahan uji (sebagai kontrol negatif), sehingga pelarut tersebut tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri artinya, pelarut DMSO 5% tersebut tidak memiliki zona hambat pada media tersebut. Jika dibandingkan dengan kotrimoksazole sebagai kontrol positif maka fraksi etil asetat memiliki zona hambat yang termasuk dalam kategori kuat, sedangkan kontrol positif (kotrimoksazole) termasuk dalam kategori kuat karena kontrol positif merupakan suatu bahan kimia yang telah terbukti dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga kontrol positif (kotrimoksazole) terbukti efektif dalam menghambat bakteri yang ditunjukkan dengan diameter zona hambat yang paling besar dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 8.

Analisis data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi diuji secara statistik Analisis of Varian (ANOVA) *oneway*. ANOVA *oneway* digunakan untuk membandingkan fraksi pada tiap konsentrasi. Data yang dianalisis dengan ANOVA *oneway* adalah konsentrasi 50%; 25%; dan 12,5% fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak etanol daun singkong, serta kontrol positif dan kontrol negatif juga diikut sertakan dalam analisis ANOVA *oneway*. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, ekstrak etanol serta kontrol positif guna mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan. Hasil data statistik dapat dilihat pada lampiran 14.

Berdasarkan tabel 7 dan analisis data maka dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi yang aktif dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan mempunyai aktivitas terbesar dibandingkan dengan fraksi *n*-heksan, fraksi air, dan ekstrak etanol daun singkong. Ekstrak etanol mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun singkong, tetapi senyawa tersebut tidak mampu bekerja secara optimum sehingga daya hambat yang terbentuk lebih kecil dibandingkan fraksi yang lain. Pada penelitian ini fraksi *n*-heksana memiliki aktivitas penghambatan paling rendah dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi air memiliki aktivitas sebagai antibakteri lebih besar dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, hal ini kemungkinan fraksi air mampu menarik senyawa yang aktif sebagai antibakteri. Senyawa aktif dalam fraksi air setelah dilakukan identifikasi senyawa dengan menggunakan uji tabung yaitu alkaloid, tanin dan saponin. Fraksi etil asetat mampu menarik senyawa yang paling aktif sebagai antibakteri, sehingga fraksi etil asetat memiliki daya hambat yang paling besar dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi lainnya. Senyawa aktif dalam fraksi etil asetat yang telah dibuktikan pada identifikasi senyawa kimia dengan uji tabung yaitu flavonoid, tanin, dan saponin. Hal ini diduga kandungan senyawa kimia yang bersifat semipolar di dalam fraksi etil asetat dapat menarik senyawa yang bersifat polar (air) maupun non polar (*n*-heksana) sehingga lebih optimum untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Putri *et al.* 2013). Etil asetat dapat digunakan sebagai pelarut karena dapat menyari senyawa-senyawa yang memberikan aktivitas antibakteri antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin (Putri *et al.* 2013).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa yang ada di dalam sel (Ngajow *et al.* 2013). Menurut Gunawan dan Mulyani (2004), senyawa flavonoid memiliki aktivitas antibakteri berdasarkan mekanisme flavonoid yang dapat mendenaturasikan protein sel dan merusak membran sel mikroorganisme dan bersifat irreversible atau tidak dapat diperbaiki lagi sehingga pertumbuhan

mikroba terhambat. Saponin mudah larut dalam air dan etanol tetapi tidak larut dalam eter. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri dengan cara 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. Hal ini mengakibatkan sel bakteri mengalami lisis (Kurniawan 2015). Tanin mempunyai sifat sebagai pengelat, menciutkan atau mengkerutkan usus sehingga gerak peristaltik usus berkurang. Akan tetapi efek spasmolitik juga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri, akibat terganggunya permeabilitas, sel tersebut tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Ajizah 2004).

11. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksinasi daun singkong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilanjutkan dengan menggunakan metode dilusi sediaan yang digunakan adalah fraksi teraktif dalam menghambat aktivitas antibakteri yang diperoleh dari hasil uji difusi. Uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun singkong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan dengan metode dilusi untuk mengetahui nilai KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). Pengujian dilakukan dengan konsentrasi larutan fraksi etil asetat masing-masing adalah 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%; kontrol negatif (fraksi teraktif dari ekstrak daun singkong tanpa penambahan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923); kontrol positif (suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dapat dilihat dari kejernihan tabung reaksi yang menunjukkan bahwa pada tabung tersebut dapat menghambat *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kemudian dari tabung tersebut dilakukan inokulasi bakteri pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA). Inokulasi dilakukan karena pada hasil penelitian tidak dapat dilihat kejernihannya pada tabung karena tertutup oleh kekeruhan dari bahan fraksi etil asetat yang digunakan. Inokulasi dari tabung pada medium agar dalam cawan petri perlu dilakukan sehingga

diketahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksinasi daun singkong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara dilusi

Sampel	Konsentrasi %	Replikasi		
		1	2	3
Fraksi etil asetat	Kontrol (-)	-	-	-
	50	-	-	-
	25	-	-	-
	12,5	-	-	-
	6,25	-	-	-
	3,12	+	+	+
	1,56	+	+	+
	0,78	+	+	+
	0,39	+	+	+
	0,19	+	+	+
	0,09	+	+	+
	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :

- + : Ada pertumbuhan koloni bakteri pada media
- : Tidak ada pertumbuhan koloni bakteri pada media
- K (+) : kontrol positif berisi suspensi bakteri
- K (-) : kontrol negatif berisi fraksi etil asetat

Berdasarkan tabel 8 menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%. Pengujian tersebut dilakukan tiga kali replikasi, hasil pengamatan pada fraksi etil asetat dengan konsentrasi 6,25%; 3,12%; 1,56%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09% terlihat adanya bakteri, sedangkan pada konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, tidak terlihat pertumbuhan bakteri begitu pula pada replikasi kedua dan ketiga, sehingga dapat disimpulkan fraksi etil asetat memiliki nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) 12,5%.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa:

Pertama, ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air daun singkong memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

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

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi etil asetat daun singkong sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yaitu pada konsentrasi 12,5%.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melakukan uji aktivitas antibakteri dari daun singkong dengan menggunakan bakteri Gram positif selain *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 .

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melakukan uji aktivitas antibakteri dari daun singkong yang dikombinasi dengan tanaman lain terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbott *et al.* 2009. Einstein@Home search for periodic gravitation waves in early S5 LIGO data. *Physical Review D*, 80 (4).
- Abdurrahman D. 2008. *Biologi Kelompok Pertanian dan Kesehatan*. Bandung: Grafindo Media Pratama.
- Agedah C, Bawo DD, Nyananyo B. 2010. Identification of antimicrobial properties of cashew *Anacardium occidentale L.* (Family Anacardiaceae). *J Appl Sci Environ. Manage* 14:25-7.
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun *Psidium Guajava L.* *Jurnal Biologi Pertanian*.
- Alamsyah HK, Widowati I, Sabdono A. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *Sargassum cinereum* (J.G. Agardh) dari perairan pulau panjang jepara terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermidis*. *Journal Of Marine Research* 3:69-78.
- Anonim. 1989. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Arifianti L, Oktarina RD, Kusumawati I. 2014. Pengaruh jenis pelarut pengestraksi terhadap kadar sinensetin dalam ekstrak daun *Orthosiphon stamineus* benth. *E-Journal Planta Husada* 2:1-4.
- Auronita Puspa. P.2016. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta Crantz.*) terhadap *Shigella sp.*
- Bayu, A dan A, Novairi. 2013. *Pencegahan dan Pengobatan Herbal*. Yogyakarta: Nusa Creativa.
- Bonang G dan Koeswardono.1982. *Mikrobiologi Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: PT Gramedia. hlm 77-78, 176-191.
- Bruckler J, Schwarz, Unterman F. 1994. *Handbuch Der Bakteriellen Infektionen Bei Tieren*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena.
- Cik Mutia,dkk. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Singkong (*Manihot esculenta Crantz*) terhadap Bakteri *Escherchia coli* dan *Staphylococcus aureus Secara In Vitro*.
- Cielsa WP, Guerrant RL, 2003. *Infectious Diarrhoea*. In: Wilson WR, Drew WL., Henry NK, et al.,ed.
- Denyer SP, Norman AH, Sean PG. 2004. *Pharmaceutical Mikrobiologi*. 7th. Victoria. Australia: Blackwell. Science. hlmn: 346-363.
- [Depkes RI], 1985. *Cara Pembuatan Simplisia* . Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.)

- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995. *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DepKes RI]. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Edisi I. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. Jakarta.
- [Depkes RI]. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 3-11.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Acuan Sediaan Herbal*. Jakarta: Diktorat Jendral POM-Depkes RI.
- Departemen Kesehatan RI. 2007. *Kebijakan Obat Tradisional*. Jakarta. Diktorat Jendral POM-Depkes RI.
- Ganiswara, S. (2007). Obat Otonom. Dalam Farmakologi dan Terapi ed.5. editor: Sulistia Ganiswara. Jakarata: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Hal: 36,56,57
- Ganiswara S, Setiabudy R, Suyatna F. 1995. *Farmakologi dan terapi*. Edisi IV. Jakarta: UI Press. Hlm 571-573
- Ganiswara. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi V. Jakarta: Gaya Baru. Hlm. 585-598
- Garrity, G, M., Bell, J, A., and Lilburn, T, G. 2004. *Taxonomic Outline of The Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriologi*. 2th Edition. Springer. New York Berlin Hendelberg. United States of America. Hal 157
- Goodman and Gilman. 2007. *Manual Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: EGC
- Green James, Rianto S. 2005. *Pengobatan Alami Mengtasi Bakteri*. Jakarta: Prestasi Pustaka
- Gritter RJ, Bobbitt JM, Schwarting AE. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Kosasih Padmawinata, Penerjemah; Bandung: ITB
- Gunawan, D. dan Mulyani, S. 2004. *Farmakognosi*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hadioetomo, R., S. 1985. Mikrobiologi dasar dalam praktek. Jakarta: PT. Gramedia

- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Dan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Kosasih P, Iwang S. Penerjemah; Sofia N, Editor. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*. Hal: 155-157
- Harborne, J, B. 2007. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. 4th. Alih Bahasa: K. Padmawinata. Bandung: ITB Press.
- Hartanti F. 2006. *Uji Daya Bakteri Salep Minyak Atsiri Daun Nilam (Pogostemon Cablin , Benth) Terhadap Punggung Kelinci yang Diinfeksi Bakteri Staphylococcus aureus ATCC 25923*, [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
- Harborne JB. 2007. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Ed ke-4. penerjemah; Padmawinata K, Soediro I. Bandung: Penerbit ITB Press.
- Hayati KE, Fasyah AG, Sa'adah L. 2010. Fraksinasi dan identifikasi senyawa tanin pada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). *Journal of Chemistry* 4:195
- Hilmi A, Sudjarwo, Darmawati A. 2013. Validasi metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri untuk penetapan kadar kolkisin dalam infus daun kembang sunghang (*Gloriosa superba Linn.*). *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi* 2:1-8.
- Indra Fatur F. 2017. *Aktivitas Antibakteri Fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun kenikir (Cosmos caudatus Kunth.) terhadap Staphylococcus aureus ATCC 25923*, [Skripsi]. Surakarta : Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
- Jayanegara A; Sofian A, 2008, Penentuan Aktivitas Biologi Tanin beberapa Hijauan secara in vitro menggunakan 'Hohenheim Gas Test' dengan Polietilonglikol secara Dertiman, *jurnal Media Peternakan* 31: 44-52
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1986. *Review of Medical Mikrobiology*. Ed ke 16, penerjemah; Gerard Bonang. Jakarta: EGC. hlm 239, 241-243.
- Jawetz, Melnick, Adelberg. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Hartanto H, Rachman C, Dimanti A, penerjemah; Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 25. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari : *Medical Microbiology*.
- Juliantina f, *et al.* 2008. Manfaat sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai agen anti bakterial terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*.

- Katno, Kusumadewi AW, Sutjipto. 2008. Pengaruh waktu pengeringan terhadap kadar tanin daun jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.). *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia* 1: 38-46.
- Kementrian RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi I. Kementrian Kesehatan RI.
- Kementrian RI. 2013. *Suplemen III Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi I. Kementrian Kesehatan RI. Hlm. 106-107
- Khopkar SM. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kurniawan B, Ferly WA. 2015. Binahong (*Cassia alata* L.) as inhibitor of *Escherichiacoli* Growth.
- 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.
- Lay BW. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Mita Ayu A. 2013. Aktivitas Antibakteri Fraksi n-Heksan Ekstrak Etanol Daging Buah Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei* dan serta bioautografinya.
- Nailul, F . 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pare (*Momordica charantia* Linn). Skripsi. Universitas Jember.
- Ngajow M, Abidjulu J, Kamu VS 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Jurnal Mipa Unsrat online* 2 (2): 128-132.
- Oei GD. 2008. *Terapi Mata Dengan Pijat dan Ramuan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Permatasari D, Pitopang R, Anam S, Ivan. 2015. Uji daya hambat ekstrak batang tumbuhan *Harrisonia Perforata* Merr. terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella Dysenteriae*. *Biocelbes* 9:1-7.
- Prasetyo H. 2012. Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Fraksi Semipolar Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*. [Skripsi]. Universitas Muhammadiyah Surakarta: Fakultas Farmasi.
- Purwono. 2009. *Budidaya 8 Jenis Tanaman Unggul*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Purwono, 2009. Tanaman Ubi Kayu.
<http://www.psychologymania.com/2012/08/tanaman-ubi-kayu.html>
 Diakses tanggal 5 Juli 2013

- Putri WS, Warditiani NK, Larasanty LPF. 2013. Skrining fitokimia ekstrak etil asetat kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) Bali: Universitas Udayana. hlm 56-60.
- Radji M. 2002. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Richardo, 2012. *Kandungan Organik Tanaman Singkong*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Setianingrum TR. 2010. Isolasi fungsi endofit penghasil antimikroba dari *Terminalia catappa* L., dan identifikasi senyawa aktifnya menggunakan bioautografi [skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.
- Sukandar Elin Y., et al., 2013. *ISO Farmakoterapi* Buku 1. Jakarta: ISFI penerbitan. Hlmn: 741-743
- Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Gramedia. hlmn: 42-44
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. 2011. Phytochemical screening and extractoin. *Internationale Pharmaceutica Sciecia* 1:98-106.
- Tjay TH dan Rahardja K. 2002. *Obat-obat Penting*. Edisi I. Jakarta: Depkes. hlm 195-203.
- Tjitrosoepomo. 2005. Pemanfaatan Bagian Tanaman Singkong. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol 8: 1-15.
- Nur Atikah. 2013. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Herba Kemangi (*Ocimum americanum* L) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*.
- Volk WA. Dan Wheeler MF. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi 5. Markham, penerjemah; Adisoemarto S, editor. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: *Basic Microbiology*. hlm 331-335.
- WHO. 2005. *The Treatment of Diarrhoea: a Manual for Physicians and Other Senior Health Workers*, 4th rev., World Healt Organization, Geneva

Lampiran 1. Surat keterangan melakukan identifikasi tanaman



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
LAB. PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Ir. Sutami 36A Kentingan Surakarta 57126 Telp. (0271) 663375 Fax (0271) 663375
http://www.biology.mipa.uns.ac.id, E-mail biologi @ mipa.uns.ac.id

Nomor : 64/UN27.9.6.4/Lab/2018
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -

Nama Pemesan : Indah Utari
NIM : 20144279A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Manihot esculenta* Crantz
Synonym : *Manihot utilissima* Pohl.
Familia : Euphorbiaceae

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-73a _____ 99. Euphorbiaceae
1b-3b-4b-6b-57b-73b-80b-81b-84b-85a-86b-87b-88a-89a _____ 48. *Manihot*
1a _____ *Manihot esculenta* Crantz

Deskripsi Tumbuhan :

Habitus : perdu, menahun, tumbuh tegak, bergetah, tinggi 2-7 m. Akar : tunggang, kalau diperbanyak dengan stek akan membentuk akar serabut yang kemudian berkembang menjadi umbi akar, umbi akar besar, panjang, kulit berwarna coklat suram, daging umbi berwarna putih hingga kuning. Batang : bulat, berkayu, sedikit bercabang atau tidak bercabang sama sekali, di bagian tengah terdapat jaringan gabus, di permukaan batang terdapat bekas dudukan tangkai daun yang bertonjolan, licin dan gundul, putih kotor. Daun : tunggal, tersusun berseling, bentuk helaian daun bulat, diameter 5-20 cm, pangkal tumpul hingga membulat, tepi berbagi menjari dengan 5-9 cangap, cangapnya berbentuk bulat telur memanjang hingga menggaris-lanset, ujung cangap runcing, lebar 1-6 cm, ujung helaian daun membulat, pertulangan menjari, permukaan atas hijau tua dan permukaan bawah hijau muda, licin dan gundul; tangkai daun bulat, hijau hingga hijau kemerahan, licin dan gundul, panjang 6-35 cm; daun penumpu sepasang, dekat pangkat tangkai daun, berlepasan, ujungnya rata, mudah rontok. Bunga : majemuk tipe tandan, 3-5 tandan berkumpul di ujung batang, pada bagian pangkal terdapat bunga betina, di bagian atas terdapat bunga jantan, panjang tenda bunga 1 cm. Bunga jantan : panjang tangkai bunga 4-6 mm, tenda bunga berbentuk lonceng, bertaju 5, benangsari 10, berseling panjang dan pendek, tertancap di sekitar penebalan dasar bunga yang kuning dan berlekuk. Bunga betina : panjang tangkai bunga 1.5-2.5 cm, kelopak bunga lebih besar daripada bunga jantan, tenda bunga berbagi 5, bakal buah dikelilingi oleh tonjolan penebalan dasar bunga yang berbentuk cincin, kuning, tangkai putik bersatu, sangat pendek, dengan kepala putik yang lebar berwarna kuning mentega dan berlekuk banyak. Buah : berbentuk seperti bola atau telur, dengan 6 papan yang membujur seperti sayap, hijau tapi berubah menjadi coklat ketika masak. Biji : kecil, terdapat alat tambahan yang berlekuk pada pangkal biji, coklat.

Surakarta, 26 Maret 2018

Kepala Lab. Program Studi Biologi

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

Penanggungjawab
Determinasi Tumbuhan

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



Lampiran 2. Foto tanaman daun singkong dan serbuk singkong



Tanaman Singkong



Serbuk daun singkong

Lampiran 3. Foto alat oven, inkubator, Vortex, dan Moisture Balance

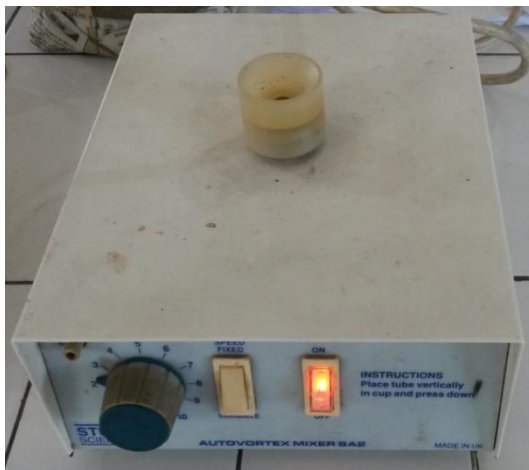


Oven



Inkubator

Vortex



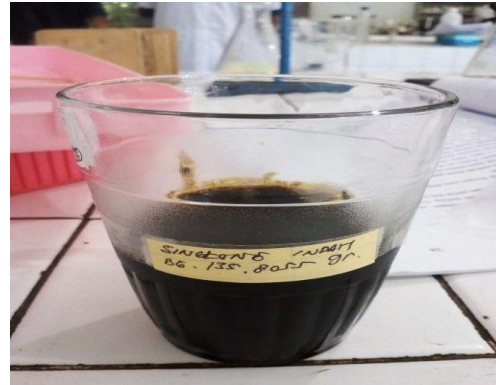
Moisture Balance



Lampiran 4. Foto ekstrak etanolik, evaporator, fraksinasi



evaporator



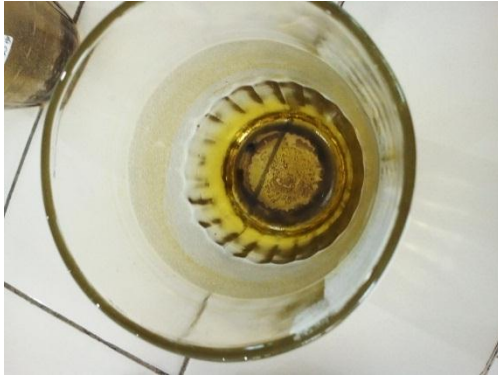
Ekstrak etanolik daun singkong



Fraksinasi

Lampiran 5. Foto fraksi *n*-heksan, etilasetat dan air

Fraksi *n*-heksan



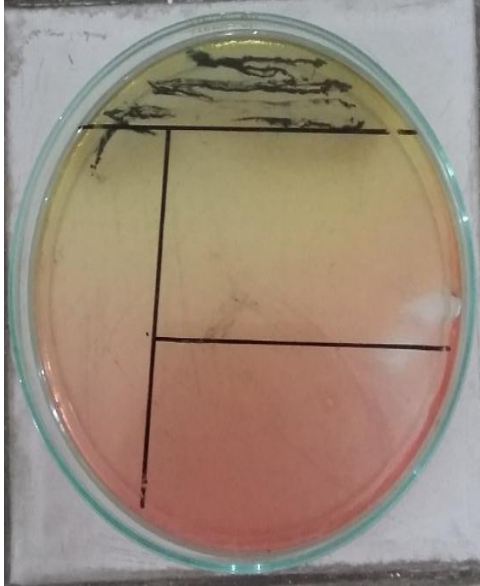
Fraksi etilasetat



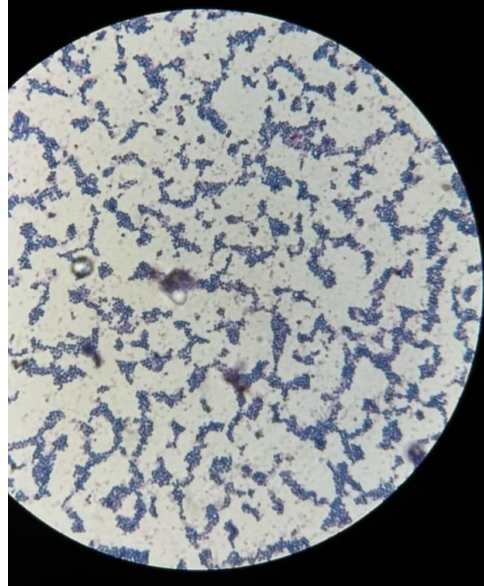
Fraksi air

Lampiran 6. Foto hasil identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara mikroskopis dan makroskopis

Makroskopis



Mikroskopis



Hasil biokimia













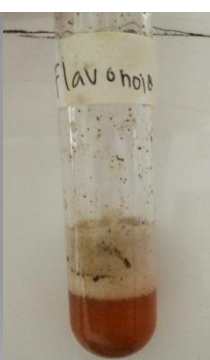


Koagulase



Katalase

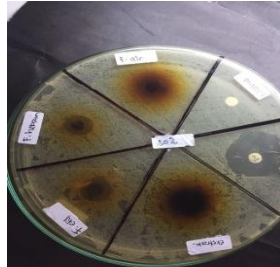


Lampiran 7. Foto identifikasi senyawa serbuk , ekstrak, dan fraksi etil asetat daun singkong

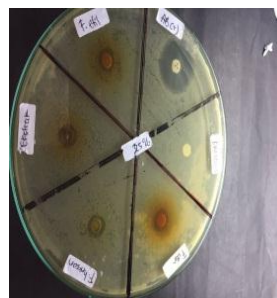
Senyawa	Serbuk	Ekstrak	Hasil		
			Fraksi etil asetat	Fraksi <i>n</i> -heksan	Fraksi air
Saponin					
Tanin					
Flavonoid					

Lampiran 8. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-, etilasetat, dan air ekstrak etanolik daun singkong secara difusi

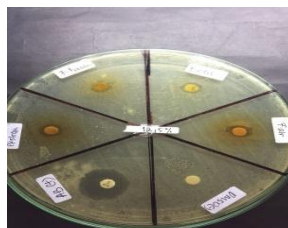
50%



25%



12,5%



Lampiran 9. Hasil dilusi fraksi etil asetat daun singkong terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Hasil dilusi fraksi etil asetat daun singkong

Lampiran 10. Hasil perhitungan rendemen simplisia daun singkong

Bobotbasah(g)	Bobotkering(g)	Rendemen (% b/b)
11.000	1.730 gram	15,72

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen serbuk} &= \frac{\text{bobot kering (g)}}{\text{bobot basah (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{1730 \text{ (g)}}{11.000 \text{ (g)}} \times 100 \% \\
 &= 15,72\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 11. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanolik, fraksi n-heksan, etilasetat dan air daun singkong**Prosentase bobot ekstrak maserasi daun singkong**

Serbukdaunsingkong (g)	Hasilekstrakkental (g)	Rendemenekstrak (%)
500	105	21

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen ekstrak etanolik} &= \frac{\text{bobot ekstrak kental (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{105 \text{ (g)}}{500 \text{ (g)}} \times 100 \% \\
 &= 21 \%
 \end{aligned}$$

Rendemen fraksi n-heksan daun singkong

Bobot ekstrak etanolik	Bobot fraksi	Rendemen (%)
30 gram	4,21 gram	14,03

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen fraksi n-heksan} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanolik (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{4,21}{30} \times 100 \% \\
 &= 14,03 \%
 \end{aligned}$$

Rendemen fraksi etil asetat daun singkong

Bobot ekstrak etanolik	Bobot fraksi	Rendemen (%)
30 gram	3,96 gram	13,2

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen fraksi etil asetat} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanolik (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{3,96}{30} \times 100 \% \\
 &= 13,2 \%
 \end{aligned}$$

Rendemen fraksi air daun singkong

Bobot ekstrak etanolik	Bobot fraksi	Rendemen (%)
30 gram	3,67 gram	33,43

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen fraksi air} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanolik (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{3,67}{30} \times 100 \% \\
 &= 33,43 \%
 \end{aligned}$$

Lampiran 12. Pembuatan larutan stok uji difusi dan dilusi

A. Larutan stok difusi

Pembuatan konsentrasi 50%

$$50\% = \frac{50 \text{ g}}{100\text{ml}}$$

$$= \frac{0,5 \text{ g}}{1\text{ml}}$$

Menimbang 0,5 g ekstrak etanolik atau fraksi kemudian masing-masing ditambahkan DMSO 5% sampai volume 1ml, kecuali fraksi air menggunakan aquadestilata steril.

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

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

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

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

Dipipet 0,5 ml sediaan awal 50% kemudian ditambah DMSO 5% sampai volume 1ml.

Pembuatan konsentrasi 12,5%

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

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

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

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

Dipipet 0,5 ml sediaan awal 25% kemudian ditambah DMSO 5% sampai volume 1ml.

B. Larutan stok dilusi

$$\text{Larutans tok } 50\% = \% \text{ b/v} = 50\text{g}/100\text{ml}$$

$$\text{Konsentrasi } 50\% = 2\text{g}/4\text{ml}$$

- Ditimbang 2 gram fraksi etil asetat kemudian dimasukkan kedalam vial dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 4ml

Tabung reaksi 3 sampai 11 diisi BHI terlebih dahulu masing-masing 1ml

Tabung 1 berisi kontrol negatif (larutan stok fraksi teraktif)

Dipipet 2ml larutan stok fraksi teraktif.

1. Konsentrasi 50%

Dipipet 1ml dari larutan stok awal lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 2

2. Konsentrasi 25%

Dipipet 1ml dari larutan stok awal lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 3 yang telah berisi BHI ad 1 ml.

3. Konsentrasi 12,5% $= V.C(25\%) = V(2ml). C(12,5\%)$

$$V = 1ml$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (25%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 4 yang telah berisi BHI 1ml.

4. Konsentrasi 6,25% $= V.C(12,5\%) = V(2ml). C(6,25\%)$

$$V = 1ml$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (12,5%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 5 yang telah berisi BHI 1ml.

5. Konsentrasi 3,125% $= V.C(6,25\%) = V(2ml). C(3,125\%)$

$$V = 2ml$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (6,25%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 6 yang telah berisi BHI 1ml.

6. Konsentrasi 1,563% $= V.C(3,125\%) = V(2ml). C(1,563\%)$

$$V = 1ml$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (3,125%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 7 yang telah berisi BHI 1ml.

7. Konsentrasi 0,781% $= V.C(1,563\%) = V(2ml). C(0,781\%)$

$$V = 1ml$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (1,563) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 8 yang telah berisi BHI 1ml.

8. Konsentrasi 0,391% $= V.C(0,781\%) = V(2ml). C(0,391\%)$

$$V = 1ml$$

Dipipet 1 ml dari larutan stok awal (0,781%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 9 yang telah berisi BHI 1ml.

$$9. \text{ Konsentrasi } 0,196\% = V.C(0,391\%) = V (2\text{ml}). C(0,196\%)$$
$$V = 1\text{ml}$$

Dipipet 1ml dari larutan stok awal (0,391%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 10 yang telah berisi BHI 1ml.

$$10. \text{ Konsentrasi } 0,098\% = V.C(0,196\%) = V (2\text{ml}). C(0,098\%)$$
$$V = 1\text{ml}$$

Dipipet 1ml dari larutan stok awal (0,196%) lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi 11 yang telah berisi BHI 1ml. dipipet dari tabung 11 sebanyak 1ml kemudian di buang.

Dari tabung reaksi 2 sampai tabung reaksi 11 masing-masing dimasukkan 1ml suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabung 12 berisi control positif yaitu suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebanyak 1ml.

Lampiran 13. Komposisi dan pembuatan media

1. Brain Heart Infusion (BHI)

Komposisi: Sari otak sapi	12 g
Sari jantung sapi.....	5 g
Proteose peptone	10 g
Bacto dextrose	2 g
NaCl	5 g
Dinatrium Fosfor	2,5 g
Bacto agar.....	15 g
Aquadest ad	1 L
pH =	7.4±0,2

Reagen tersebut diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml. Dipanaskan sampai larut sempurna, dituangkan dalam tabung reaksi steril, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

2. Formulasi dan pembuatan Vogel Jhonson Agar (VJA)

Peptone darikasein	10,0 g
Ekstrakragi	5,0 g
Hidrogenfosfat.....	5,0 g
D (-) Manitol	10,0 g
Klorida lithium.....	5,0 g
Glisine	10,0 g
Phenol red	0,025 g
Agar	13,0 g

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.

3. Formulasi dan pembuatan Muller Hinton Agar (MHA)

Beef Extract	2g
Acid Hydrolysate of Casein	17,5 g
Starch	1,5 g

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

4. Pembuatan suspensi McFarland 0,5

Suspensi Standart Mc. Farland adalah suspensi yang menunjukkan konsentrasi kekeruhan bakteri sama dengan 10^8CFU/ml .

Komposisi:

Larutan Asam Sulfat..... 1 % b/v 9,5 ml

Larutan Barium klorida..... 1,175% v/v 0,5 ml

Cara pembuatan:

Dicampur kedua larutan tersebut dalam tabung reaksi dikocok dan dihomogenkan. Apabila kekeruhan suspensi bakteri uji adalah sama dengan kekeruhan suspensi standart, berarti konsentrasi suspensi bakteri adalah 10^8CFU/ml (Bridson 1998).

Lampiran 14. Hasil analisis data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		diamterhambat
N		42
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	12.5476
	Std. Deviation	5.70922
Most Extreme Differences	Absolute	.131
	Positive	.131
	Negative	-.108
Kolmogorov-Smirnov Z		.847
Asymp. Sig. (2-tailed)		.470

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Diamterhambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.800	13	28	.094

ANOVA

diamterhambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	906.500	13	69.731	88.748	.000
Within Groups	22.000	28	.786		
Total	928.500	41			

diamterhambat

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
DMSO 5%	3	.0000								
fraksi air 12,5%	3		7.6667							
fraksi n-heksan 12,5%	3		8.0000	8.0000						
fraksi air 25%	3		9.3333	9.3333	9.3333					
fraksi n-heksan 25%	3			9.6667	9.6667					
fraksi air 50%	3				10.3333	10.3333				
fraksi n-heksan 50%	3				11.0000	11.0000				
ekstrak 12,5%	3					11.6667				
ekstrak 25%	3						15.6667			
fraksi etil asetat 12,5%	3						15.6667			
ekstrak 50%	3						17.3333			
fraksi etil asetat 25%	3						17.3333			
fraksi etil asetat 50%	3							19.333		
									3	
kotrimoksazole	3									22.6667
Sig.		1.000	.066	.066	.066	.266	.066	1.000	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Multiple Comparisons

diamterhambat
Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak 50%	ekstrak 25%	1.33333	.72375	.839	-1.3159	3.9825
	ekstrak 12,5%	3.00000	.72375	.016	.3508	5.6492
	fraksi n-heksan 50%	1.00000	.72375	.977	-1.6492	3.6492
	fraksi n-heksan 25%	2.33333	.72375	.127	-.3159	4.9825
	fraksi n-heksan 12,5%	3.33333	.72375	.005	.6841	5.9825
	fraksi etil asetat 50%	-2.66667	.72375	.047	-5.3159	-.0175
	fraksi etil asetat 25%	-2.00000	.72375	.297	-4.6492	.6492
	fraksi etil asetat 12,5%	-.33333	.72375	1.000	-2.9825	2.3159
	fraksi air 50%	3.33333	.72375	.005	.6841	5.9825
	fraksi air 25%	4.00000	.72375	.000	1.3508	6.6492
	fraksi air 12,5%	5.00000	.72375	.000	2.3508	7.6492
	kotrimoksazole	-11.66667	.72375	.000	-14.3159	-9.0175
	DMSO 5%	9.66667	.72375	.000	7.0175	12.3159
ekstrak 25%	ekstrak 50%	-1.33333	.72375	.839	-3.9825	1.3159
	ekstrak 12,5%	1.66667	.72375	.566	-.9825	4.3159
	fraksi n-heksan 50%	-.33333	.72375	1.000	-2.9825	2.3159
	fraksi n-heksan 25%	1.00000	.72375	.977	-1.6492	3.6492
	fraksi n-heksan 12,5%	2.00000	.72375	.297	-.6492	4.6492
	fraksi etil asetat 50%	-4.00000	.72375	.000	-6.6492	-1.3508
	fraksi etil asetat 25%	-3.33333	.72375	.005	-5.9825	-.6841
	fraksi etil asetat 12,5%	-1.66667	.72375	.566	-4.3159	.9825
	fraksi air 50%	2.00000	.72375	.297	-.6492	4.6492
	fraksi air 25%	2.66667	.72375	.047	.0175	5.3159
	fraksi air 12,5%	3.66667	.72375	.002	1.0175	6.3159
kotrimoksazole	-13.00000	.72375	.000	-15.6492	-10.3508	
DMSO 5%	8.33333	.72375	.000	5.6841	10.9825	
ekstrak 12,5%	ekstrak 50%	-3.00000	.72375	.016	-5.6492	-.3508
	ekstrak 25%	-1.66667	.72375	.566	-4.3159	.9825
	fraksi n-heksan 50%	-2.00000	.72375	.297	-4.6492	.6492
	fraksi n-heksan 25%	-.66667	.72375	.999	-3.3159	1.9825
	fraksi n-heksan 12,5%	.33333	.72375	1.000	-2.3159	2.9825
	fraksi etil asetat 50%	-5.66667	.72375	.000	-8.3159	-3.0175
	fraksi etil asetat 25%	-5.00000	.72375	.000	-7.6492	-2.3508
	fraksi etil asetat 12,5%	-3.33333	.72375	.005	-5.9825	-.6841
	fraksi air 50%	.33333	.72375	1.000	-2.3159	2.9825
fraksi air 25%	1.00000	.72375	.977	-1.6492	3.6492	

	fraksi air 12,5%	2.00000	.72375	.297	-.6492	4.6492
	kotrimoksazole	-14.66667	.72375	.000	-17.3159	-12.0175
	DMSO 5%	6.66667	.72375	.000	4.0175	9.3159
fraksi n-heksan 50%	ekstrak 50%	-1.00000	.72375	.977	-3.6492	1.6492
	ekstrak 25%	.33333	.72375	1.000	-2.3159	2.9825
	ekstrak 12,5%	2.00000	.72375	.297	-.6492	4.6492
	fraksi n-heksan 25%	1.33333	.72375	.839	-1.3159	3.9825
	fraksi n-heksan 12,5%	2.33333	.72375	.127	-.3159	4.9825
	fraksi etil asetat 50%	-3.66667	.72375	.002	-6.3159	-1.0175
	fraksi etil asetat 25%	-3.00000	.72375	.016	-5.6492	-.3508
	fraksi etil asetat 12,5%	-1.33333	.72375	.839	-3.9825	1.3159
	fraksi air 50%	2.33333	.72375	.127	-.3159	4.9825
	fraksi air 25%	3.00000	.72375	.016	.3508	5.6492
	fraksi air 12,5%	4.00000	.72375	.000	1.3508	6.6492
	kotrimoksazole	-12.66667	.72375	.000	-15.3159	-10.0175
	DMSO 5%	8.66667	.72375	.000	6.0175	11.3159
	fraksi n-heksan 25%	ekstrak 50%	-2.33333	.72375	.127	-4.9825
ekstrak 25%		-1.00000	.72375	.977	-3.6492	1.6492
ekstrak 12,5%		.66667	.72375	.999	-1.9825	3.3159
fraksi n-heksan 50%		-1.33333	.72375	.839	-3.9825	1.3159
fraksi n-heksan 12,5%		1.00000	.72375	.977	-1.6492	3.6492
fraksi etil asetat 50%		-5.00000	.72375	.000	-7.6492	-2.3508
fraksi etil asetat 25%		-4.33333	.72375	.000	-6.9825	-1.6841
fraksi etil asetat 12,5%		-2.66667	.72375	.047	-5.3159	-.0175
fraksi air 50%		1.00000	.72375	.977	-1.6492	3.6492
fraksi air 25%		1.66667	.72375	.566	-.9825	4.3159
fraksi air 12,5%		2.66667	.72375	.047	.0175	5.3159
kotrimoksazole		-14.00000	.72375	.000	-16.6492	-11.3508
DMSO 5%	7.33333	.72375	.000	4.6841	9.9825	
fraksi n-heksan 12,5%	ekstrak 50%	-3.33333	.72375	.005	-5.9825	-.6841
	ekstrak 25%	-2.00000	.72375	.297	-4.6492	.6492
	ekstrak 12,5%	-.33333	.72375	1.000	-2.9825	2.3159
	fraksi n-heksan 50%	-2.33333	.72375	.127	-4.9825	.3159
	fraksi n-heksan 25%	-1.00000	.72375	.977	-3.6492	1.6492
	fraksi etil asetat 50%	-6.00000	.72375	.000	-8.6492	-3.3508
	fraksi etil asetat 25%	-5.33333	.72375	.000	-7.9825	-2.6841
	fraksi etil asetat 12,5%	-3.66667	.72375	.002	-6.3159	-1.0175
	fraksi air 50%	.00000	.72375	1.000	-2.6492	2.6492
	fraksi air 25%	.66667	.72375	.999	-1.9825	3.3159
	fraksi air 12,5%	1.66667	.72375	.566	-.9825	4.3159
	kotrimoksazole	-15.00000	.72375	.000	-17.6492	-12.3508
	DMSO 5%	6.33333	.72375	.000	3.6841	8.9825
fraksi etil asetat 50%	ekstrak 50%	2.66667	.72375	.047	.0175	5.3159
	ekstrak 25%	4.00000	.72375	.000	1.3508	6.6492

	ekstrak 12,5%	5.66667	.72375	.000	3.0175	8.3159
	fraksi n-heksan 50%	3.66667	.72375	.002	1.0175	6.3159
	fraksi n-heksan 25%	5.00000	.72375	.000	2.3508	7.6492
	fraksi n-heksan 12,5%	6.00000	.72375	.000	3.3508	8.6492
	fraksi etil asetat 25%	.66667	.72375	.999	-1.9825	3.3159
	fraksi etil asetat 12,5%	2.33333	.72375	.127	-.3159	4.9825
	fraksi air 50%	6.00000	.72375	.000	3.3508	8.6492
	fraksi air 25%	6.66667	.72375	.000	4.0175	9.3159
	fraksi air 12,5%	7.66667	.72375	.000	5.0175	10.3159
	kotrimoksazole	-9.00000	.72375	.000	-11.6492	-6.3508
	DMSO 5%	12.33333	.72375	.000	9.6841	14.9825
fraksi etil asetat 25%	ekstrak 50%	2.00000	.72375	.297	-.6492	4.6492
	ekstrak 25%	3.33333	.72375	.005	.6841	5.9825
	ekstrak 12,5%	5.00000	.72375	.000	2.3508	7.6492
	fraksi n-heksan 50%	3.00000	.72375	.016	.3508	5.6492
	fraksi n-heksan 25%	4.33333	.72375	.000	1.6841	6.9825
	fraksi n-heksan 12,5%	5.33333	.72375	.000	2.6841	7.9825
	fraksi etil asetat 50%	-.66667	.72375	.999	-3.3159	1.9825
	fraksi etil asetat 12,5%	1.66667	.72375	.566	-.9825	4.3159
	fraksi air 50%	5.33333	.72375	.000	2.6841	7.9825
	fraksi air 25%	6.00000	.72375	.000	3.3508	8.6492
	fraksi air 12,5%	7.00000	.72375	.000	4.3508	9.6492
	kotrimoksazole	-9.66667	.72375	.000	-12.3159	-7.0175
	DMSO 5%	11.66667	.72375	.000	9.0175	14.3159
	fraksi etil asetat 12,5%	ekstrak 50%	.33333	.72375	1.000	-2.3159
ekstrak 25%		1.66667	.72375	.566	-.9825	4.3159
ekstrak 12,5%		3.33333	.72375	.005	.6841	5.9825
fraksi n-heksan 50%		1.33333	.72375	.839	-1.3159	3.9825
fraksi n-heksan 25%		2.66667	.72375	.047	.0175	5.3159
fraksi n-heksan 12,5%		3.66667	.72375	.002	1.0175	6.3159
fraksi etil asetat 50%		-2.33333	.72375	.127	-4.9825	.3159
fraksi etil asetat 25%		-1.66667	.72375	.566	-4.3159	.9825
fraksi air 50%		3.66667	.72375	.002	1.0175	6.3159
fraksi air 25%		4.33333	.72375	.000	1.6841	6.9825
fraksi air 12,5%		5.33333	.72375	.000	2.6841	7.9825
kotrimoksazole		-11.33333	.72375	.000	-13.9825	-8.6841
DMSO 5%		10.00000	.72375	.000	7.3508	12.6492
fraksi air 50%		ekstrak 50%	-3.33333	.72375	.005	-5.9825
	ekstrak 25%	-2.00000	.72375	.297	-4.6492	.6492
	ekstrak 12,5%	-.33333	.72375	1.000	-2.9825	2.3159
	fraksi n-heksan 50%	-2.33333	.72375	.127	-4.9825	.3159
	fraksi n-heksan 25%	-1.00000	.72375	.977	-3.6492	1.6492
	fraksi n-heksan 12,5%	.00000	.72375	1.000	-2.6492	2.6492
	fraksi etil asetat 50%	-6.00000	.72375	.000	-8.6492	-3.3508

	fraksi etil asetat 25%	-5.33333	.72375	.000	-7.9825	-2.6841
	fraksi etil asetat 12,5%	-3.66667	.72375	.002	-6.3159	-1.0175
	fraksi air 25%	.66667	.72375	.999	-1.9825	3.3159
	fraksi air 12,5%	1.66667	.72375	.566	-.9825	4.3159
	kotrimoksazole	-15.00000	.72375	.000	-17.6492	-12.3508
	DMSO 5%	6.33333	.72375	.000	3.6841	8.9825
fraksi air 25%	ekstrak 50%	-4.00000	.72375	.000	-6.6492	-1.3508
	ekstrak 25%	-2.66667	.72375	.047	-5.3159	-.0175
	ekstrak 12,5%	-1.00000	.72375	.977	-3.6492	1.6492
	fraksi n-heksan 50%	-3.00000	.72375	.016	-5.6492	-.3508
	fraksi n-heksan 25%	-1.66667	.72375	.566	-4.3159	.9825
	fraksi n-heksan 12,5%	-.66667	.72375	.999	-3.3159	1.9825
	fraksi etil asetat 50%	-6.66667	.72375	.000	-9.3159	-4.0175
	fraksi etil asetat 25%	-6.00000	.72375	.000	-8.6492	-3.3508
	fraksi etil asetat 12,5%	-4.33333	.72375	.000	-6.9825	-1.6841
	fraksi air 50%	-.66667	.72375	.999	-3.3159	1.9825
	fraksi air 12,5%	1.00000	.72375	.977	-1.6492	3.6492
	kotrimoksazole	-15.66667	.72375	.000	-18.3159	-13.0175
	DMSO 5%	5.66667	.72375	.000	3.0175	8.3159
fraksi air 12,5%	ekstrak 50%	-5.00000	.72375	.000	-7.6492	-2.3508
	ekstrak 25%	-3.66667	.72375	.002	-6.3159	-1.0175
	ekstrak 12,5%	-2.00000	.72375	.297	-4.6492	.6492
	fraksi n-heksan 50%	-4.00000	.72375	.000	-6.6492	-1.3508
	fraksi n-heksan 25%	-2.66667	.72375	.047	-5.3159	-.0175
	fraksi n-heksan 12,5%	-1.66667	.72375	.566	-4.3159	.9825
	fraksi etil asetat 50%	-7.66667	.72375	.000	-10.3159	-5.0175
	fraksi etil asetat 25%	-7.00000	.72375	.000	-9.6492	-4.3508
	fraksi etil asetat 12,5%	-5.33333	.72375	.000	-7.9825	-2.6841
	fraksi air 50%	-1.66667	.72375	.566	-4.3159	.9825
	fraksi air 25%	-1.00000	.72375	.977	-3.6492	1.6492
	kotrimoksazole	-16.66667	.72375	.000	-19.3159	-14.0175
	DMSO 5%	4.66667	.72375	.000	2.0175	7.3159
kotrimoksazole	ekstrak 50%	11.66667	.72375	.000	9.0175	14.3159
	ekstrak 25%	13.00000	.72375	.000	10.3508	15.6492
	ekstrak 12,5%	14.66667	.72375	.000	12.0175	17.3159
	fraksi n-heksan 50%	12.66667	.72375	.000	10.0175	15.3159
	fraksi n-heksan 25%	14.00000	.72375	.000	11.3508	16.6492
	fraksi n-heksan 12,5%	15.00000	.72375	.000	12.3508	17.6492
	fraksi etil asetat 50%	9.00000	.72375	.000	6.3508	11.6492
	fraksi etil asetat 25%	9.66667	.72375	.000	7.0175	12.3159
	fraksi etil asetat 12,5%	11.33333	.72375	.000	8.6841	13.9825
	fraksi air 50%	15.00000	.72375	.000	12.3508	17.6492
	fraksi air 25%	15.66667	.72375	.000	13.0175	18.3159
	fraksi air 12,5%	16.66667	.72375	.000	14.0175	19.3159

	DMSO 5%	21.33333	.72375	.000	18.6841	23.9825
DMSO 5%	ekstrak 50%	-9.66667	.72375	.000	-12.3159	-7.0175
	ekstrak 25%	-8.33333	.72375	.000	-10.9825	-5.6841
	ekstrak 12,5%	-6.66667	.72375	.000	-9.3159	-4.0175
	fraksi n-heksan 50%	-8.66667	.72375	.000	-11.3159	-6.0175
	fraksi n-heksan 25%	-7.33333	.72375	.000	-9.9825	-4.6841
	fraksi n-heksan 12,5%	-6.33333	.72375	.000	-8.9825	-3.6841
	fraksi etil asetat 50%	-12.33333	.72375	.000	-14.9825	-9.6841
	fraksi etil asetat 25%	-11.66667	.72375	.000	-14.3159	-9.0175
	fraksi etil asetat 12,5%	-10.00000	.72375	.000	-12.6492	-7.3508
	fraksi air 50%	-6.33333	.72375	.000	-8.9825	-3.6841
	fraksi air 25%	-5.66667	.72375	.000	-8.3159	-3.0175
	fraksi air 12,5%	-4.66667	.72375	.000	-7.3159	-2.0175
	kotrimoksazole	-21.33333	.72375	.000	-23.9825	-18.6841

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