

LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Hasil Uji *Pseudomonas aeruginosa*

PRO - Technology
Laboratorium Uji Mikrobiologi
 Jalan Cempaka Putih No.69 - Jakarta Pusat
 Indonesia

SERTIFIKAT HASIL UJI

1. Bakteri : Stock Strain *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
2. Nomor Uji Bakteri : V. 1. 3.
3. Tanggal Uji bakteri : 2 - 7 November 2020

Uraian Hasil Uji

V. 1. 3. Biakan Murni *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- I. Ciri-ciri koloni :
 1. Pewarnaan Gram : Sel batang, kecil-kecil, menyebar, berwarna merah, termasuk Gram negatif.
 2. Di tanam pada media Endo Agar : koloni bakteri merah transparan dan melebar.
 3. Di tanam pada media Mac Conkey Agar : koloni bakteri coklat transparan, melebar, dan pada suhu kamar membentuk warna hijau tua (mengeluarkan pigmen pyocyanin yang berwarna hijau).
 4. Di tanam pada media *Pseudomonas* Selektif Agar Agar : Koloni warna putih, disekitar koloni berwarna hijau.

II. Uji Fermentasi Karbohidrat dan Biokimia Penegasan

Uji Fisiologi bakteri	Hasil Uji
1. KIA	K/K S : 0
2. SIM	0 d 0
3. LIA	K/k S : 0
4. CITRAT	+
5. LDS	LDC : + H ₂ S = 0
6. MRVP	MR : 0 VP : 0
7. UREA	UREASE : 0
8. PAD	PPA : 0
9. GLUKOSA	ASAM : 0 GAS : 0
10. LAKTOSA	ASAM : 0 GAS : 0
11. MALTOSA	ASAM : 0 GAS : 0
12. SUKROSA	ASAM : 0 GAS : 0

Catatan:

1. Hasil Uji ini hanya berlaku untuk contoh yang diuji.



Lampiran 2. Hasil Determinasi



UPT-LABORATORIUM

Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo-Solo 57127 Telp. 0271-852518, Fax. 0271-853275

Nomor : 190/DET/UPT-LAB/21.03.2021
Hal : Hasil determinasi tumbuhan
Lamp. :-

Nama Pemesan : Fita Sari
NIM : 10170622N
Alamat : Program Studi D4 Analis Kesehatan,
Universitas Setia Budi, Surakarta
Nama sampel : *Cosmos caudatus* H.B.K./Kenikir

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Klasifikasi

Kingdom : Plantae
Super Divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Asterales
Famili : Asteraceae
Genus : *Cosmos*
Species : *Cosmos caudatus* H.B.K.

Hasil Determinasi menurut Steenis, C.G.G.J.V, Bloembergen, H, Eyma, P.J. 1992 :

1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9b – 10b – 11b – 12b – 13b – 14b – 16b. golongan 11. 286b – 288b – 289b. 121. Familia Compositae. 1b – 12a – 13b – 15a. 14. *Cosmos*. *Cosmos caudatus* H.B.K.

Deskripsi :

Habitus : Herba 1 tahun, kokoh kuat, tegak, sering bercabang banyak, jika diremas aromatis, tinggi 1 – 2,5 m.
Akar : Sistem akar tunggang.
Batang : Batang segiempat, beralur membujur, berambut jarang.

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

- Daun : Daun tunggal, berhadapan, tangkai panjang; helaian dari yang rendah menyirip rangkap 3 – 4 atau berbagi menyirip, 4,5 – 5,8 cm panjang dan lebarnya; daun yang atas berturut-turut bertangkai makin pendek, lebih kecil, kurang berbagi.
- Bunga : Bunga majemuk bongkol terminal atau di ketiak daun, bertangkai panjang; tangkai berusuk. Daun pembalut 8 yang terluar hijau, kemudian berujung melengkung kembali, 8 yang terdalam dari warna dengan warna yang sama dengan bunga tepinya, tegak; dasar bunga majemuk dengan sisik-sisik jerami. Bunga tepi 8, banci; pinggiran memanjang hingga bulat telur terbalik, dengan ujung bergigi 3, merah atau kuning keputihan. Bunga cakram banyak, berkelamin 2; mahkota tinggi 1 cm, bertaju 5, pucat dengan ujung kuning. Tabung kepala sari coklat kehitaman. Cabang tangkai putik 2, runcing, bagian luar berambut panjang.
- Buah : Buah keras, bentuk spul sempit, beralur, coklat kehitaman, berparuh; paruh 1 – 1,5 cm panjangnya, menjadi lebih pendek jika berasal dari bunga yang makin keluar letaknya, pada ujung dengan tombol pucat, yang berambut sikat langsung 2 – 3.

Kepala UPT-LAB
Universitas Setia Budi

Asik Gunawan, Amdk

Surakarta, 20 Maret 2021
Penanggung jawab
Determinasi Tumbuhan


Dra. Dewi Sulistyawati. M.Sc.

Lampiran 3. Alat dan Bahan



Serbuk Daun Kenikir



Rangkaian Alat *Bidwell-Sterling*



Rotary Evaporator



Oven



Autoclave



Inkubator



Konsentrasi Ekstrak



Hasil Maserasi



Hasil Ekstraksi

Lampiran 4. Hasil Uji Fitokimia

Uji Flavonoid (+)



Uji Saponin (+)



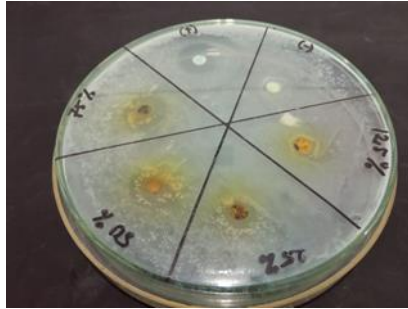
Uji Tanin (+)



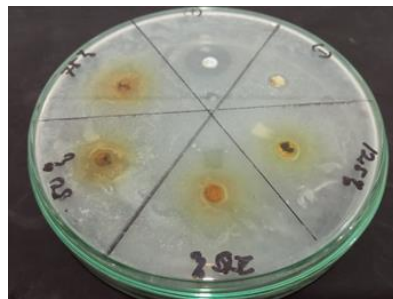
Uji Alkaloid (+)



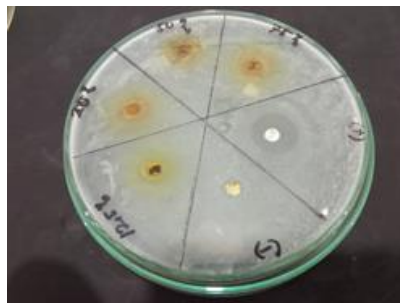
Uji Terpenoid (+)

Lampiran 5. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi

Uji Antibakteri
Pseudomonas aeruginosa
Pengulangan 1



Uji Antibakteri
Pseudomonas aeruginosa
Pengulangan 2



Uji Antibakteri
Pseudomonas aeruginosa
Pengulangan 3

Lampiran 6. Formulasi Media Reagen

1. Komposisi Cat Gram

- Cat Gram A (warna ungu)

Kristal violet	2 gram
Etil Alkohol 95%	20 ml
Amonium oksalat	0,8 gram
Aquadest	80 ml

- Cat gram B (warna coklat)

Yodium	1 gram
Kalium Iodida	2 gram
Aquadest	300 ml

- Cat gram C (tidak berwarna)

Aceton	50 ml
Etil alkohol	10 ml

- Cat gram D (warna merah)

Safranin	0,25 gram
Etil alkohol	10 ml
Aquadest	90 ml

2. Media BHI (*Brain Heart Infusion*)

Brain Infusion Solids	12,5 g/l
Brain Heart Infusion Solids	5,0 g/l
Protease Peptone	10,0 g/l
Glucose	2,0 g/l
Sodium chloride	5,0 g/l

Disodium hydrogen phosphate	2,5 g/l
Agar	10,0 g/l
3. Media PSA (<i>Pseudomonas Selective Agar</i>)	
Gelatin peptone	20,0 g/l
Magnesium chloride	1,4 g/l
Pottasium sulphate	10,0 g/l
Cetrimide	0,3 g/l
Agar	3 g/l
4. Media MHA (<i>Mueller Hinton Agar</i>)	
Beef, dehydrate infusion from	300,0 g/l
Casein hydrolysate	17,5 g/l
Starch	1,5 g/l
Agar	17,0 g/l
5. Media KIA (<i>Kliger's Iron Agar</i>)	
'Lab-lemco' Powder	3,0 g/l
Yeast extract	3,0 g/l
Peptone	20,0 g/l
Sodium chloride	5,0 g/l
Lactose	10,0 g/l
Glucose	1,0 g/l
Ferric citrate	0,3 g/l
Sodium thiosulphate	0,3 g/l
Phenol red	0,05 g/l

Agar	12,0 g/l
6. Media SIM (<i>Sulfida Indol Moltility</i>)	
Tryptone	20,0 g/l
Peptone	6,1 g/l
Ferrous ammonium sulphate	0,2 g/l
Sodium thosulphate	0,2 g/l
Agar	3,5 g/l
7. Media LIA (<i>Lysine Iron Agar</i>)	
Bacteriological peptone	5,0 g/l
Yeast extract	3,0 g/l
Glucose	1,0 g/l
L-lysine	10,0 g/l
Ferric ammonium citrate	0,5 g/l
Sodium thiosulphate	0,04 g/l
Bromocresol purple	0,02 g/l
Agar	14,5 g/l
8. Media Citrat (<i>Simmon Citrate Agar</i>)	
Magnesium sulphate	0,2 g/l
Ammonium dyhydrogen phosphate	0,2 g/l
Sodium ammonium phosphate	0,8 g/l
Sodium citrate, tribasic	2,0 g/l
Sodium chloride	5,0 g/l
Bromothymol blue	0,08 g/l

Agar	15,0 g/l
------	----------

9. Standart *Mc. Farland*

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

Komposisi :

Larutan Asam Sulfat	1 % b/v 9,5 ml
Larutan Barium klorida	1,175% v/v 0,5 ml

Cara Pembuatan :

- Larutan H₂SO₄ 0,36 N sebanyak 9,5 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer
- BaCl₂.2H₂O 1,175% ditambahkan sebanyak 0,5 ml
- Larutan dihomogenkan sampai terbentuk kekeruhan dan dipakai sebagai standar kekeruhan bakteri uji.

10. Reagen Erlich

- Erlich A

<i>Paradimethyl Amino Banzaldehyde</i>	2 gram
Alkohol 95%	190 ml
HCl _{conc}	40 ml

- Erlich B

Kalium Persulfat (K₂S₂O₄) jenuh dalam *Aquadest*

Lampiran 7. Uji Penetapan Kadar Air



Diketahui :

Kadar air pada skala receiver = 0,8 mL

Berat bahan = 10,0106 gram

Perhitungan :

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{\text{Volume air pada skala}}{\text{Berat bahan}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,8 \text{ ml}}{10,0106 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 7,9\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 8. Perhitungan Pembuatan Konsentrasi

Diketahui

Konsentrasi	M1	V1	M2
12,5%	100%	5 mL	12,55
25%	100%	5mL	25%
50%	100%	5mL	50%
75%	100%	5 mL	75%

Keterangan :

M1 = Konsentrasi awal

V2 = Volume yang akan dibuat

M2 = Konsentrasi yang akan dibuat

Perhitungan :

$$\text{Konsentrasi 12,5\% : } V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 100\% = 5 \text{ mL} \times 12,5\%$$

$$V1 = \frac{5 \text{ mL} \times 12,5\%}{100\%}$$

$$= 0,625 \text{ mL}$$

Jadi, sebanyak 0,625 mL ekstrak konsentrasi 100% dilarutkan dalam 4,375 ml pelarut DMSO 2%.

$$\text{Konsentrasi 25\% : } V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 100\% = 5 \text{ mL} \times 25\%$$

$$\begin{aligned}
 V1 &= \frac{5 \text{ mL} \times 25\%}{100\%} \\
 &= 1,25 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Jadi, sebanyak 1,25 mL ekstrak konsentrasi 100% dilarutkan dalam 3,75 ml pelarut DMSO 2%.

Konsentrasi 50% :

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 100\% = 5 \text{ mL} \times 50\%$$

$$\begin{aligned}
 V1 &= \frac{5 \text{ mL} \times 50\%}{100\%} \\
 &= 2,5 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Jadi, sebanyak 2,5 ml ekstrak konsentrasi 100% dilarutkan dalam 2,5 ml pelarut DMSO 2%.

Konsentrasi 75% :

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 100\% = 5 \text{ mL} \times 75\%$$

$$\begin{aligned}
 V1 &= \frac{5 \text{ mL} \times 75\%}{100\%} \\
 &= 3,75 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Jadi, sebanyak 3,75 ml ekstrak konsentrasi 100% dilarutkan dalam 1,25 ml pelarut DMSO 2%.

Lampiran 9. Perhitungan Rendemen Ekstrak Kenikir

Serbuk daun kenikir (gram)	Berat wadah kosong (gram)	Berat wadah + ekstrak (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
300	322,37	344,19	21,82	7,27

Perhitungan Berat Ekstrak

$$\text{Berat wadah + Ekstrak} = 344,19, \text{ g}$$

$$\text{Berat Wadah Kosong} = 322,37 \text{ g}$$

$$\text{Berat Ekstrak} = 21,82 \text{ g}$$

Perhitugn % rendemen ekstrak

$$\% \text{ Ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak serbuk}}{\text{Berat Serbuk}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Ekstrak} = \frac{21,82 \text{ g}}{300 \text{ g}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Ekstrak} = 7,27 \%$$

Lampiran 10. Hasil Uji Statistik

Tests of Normality ^b							
	Konsentrasi Ekstrak Etanolik Daun Kenikir	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Diameter Zona Hambat Terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,5%	.253	3	.	.964	3	.637
	25%	.175	3	.	1.000	3	1.000
	50%	.253	3	.	.964	3	.637
	75%	.253	3	.	.964	3	.637
	Kontrol Positif	.253	3	.	.964	3	.637

a. Lilliefors Significance Correction

b. Diameter Zona Hambat Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* is constant when Konsentrasi Ekstrak Etanolik Daun Kenikir = Kontrol Negatif. It has been omitted.

Keterangan

Ho : data berdistribusi normal

H1 : data tidak berdistribusi normal

Dasar pengambilan keputusan :

Jika nilai signifikansi (probabilitas) $> 0,05$ maka Ho diterima

Jika nilai signifikansi (probabilitas) $< 0,05$ maka Ho ditolak

Tabel uji *Shapiro – wilk* menunjukkan nilai signifikansi untuk diameter zona hambat pada ekstrak etanolik daun kenikir konsentrasi 12,5% sebesar 0,637, konsentrasi 25% sebesar 1,000, konsentrasi 50% sebesar 0,637, konsentrasi 75% sebesar 0,637 dan kontrol positif sebesar 0,637. Berdasarkan data tersebut seluruh nilai signifikansi $> 0,05$ (Ho diterima) maka dapat disimpulkan data tersebut mengikuti distribusi normal sehingga dapat dilakukan analisis *One Way Anova*.

Test of Homogeneity of Variances

Diameter Zona Hambat Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.639	5	12	.224

Berdasarkan output spss test of homogeneity of variances diperoleh nilai signifikansi (Sig) sebesar $0,224 > 0,05$, maka dapat disimpulkan bahwa varian semua kelompok sampel konsentrasi ekstrak etanolik daun kenikir yang kita bandingkan tersebut adalah sama atau homogen. Sehingga asumsi homogenitas dalam uji one way anova terpenuhi.

ANOVA

Diameter Zona Hambat Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1065.778	5	213.156	123.768	.000
Within Groups	20.667	12	1.722		
Total	1086.444	17			

Keterangan

Dasar pengambilan keputusan :

Jika nilai signifikansi (Sig) $> 0,05$ maka rata-rata sama

Jika nilai signifikansi (Sig) $< 0,05$ maka rata-rata berbeda

Berdasarkan output Anova diketahui nilai sig sebesar $0,000 < 0,005$ sehingga dapat disimpulkan bahwa rata-rata kelima konsentrasi ekstrak etanolik daun kenikir tersebut berbeda secara signifikan.

Descriptives

Diameter Zona Hambat Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
12,5%	3	8.67	1.528	.882	4.87	12.46	7	10
25%	3	12.00	1.000	.577	9.52	14.48	11	13
50%	3	16.33	1.528	.882	12.54	20.13	15	18
75%	3	21.33	1.528	.882	17.54	25.13	20	23
Kontrol Positif	3	24.33	2.517	1.453	18.08	30.58	22	27
Total	15	16.53	6.140	1.585	13.13	19.93	7	27

Pos Hoc Test

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter Zona Hambat Terhadap Pseudomonas aeruginosa

Tukey HSD

(I) Konsentrasi Ekstrak Etanolik Daun Kenikir	(J) Konsentrasi Ekstrak Etanolik Daun Kenikir	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
12,5%	25%	-3.333	1.072	.076	-6.93	.27
	50%	-7.667*	1.072	.000	-11.27	-4.07
	75%	-12.667*	1.072	.000	-16.27	-9.07
	Kontrol Positif	-13.667*	1.072	.000	-17.27	-10.07
	Kontrol Negatif	8.667*	1.072	.000	5.07	12.27
25%	12,5%	3.333	1.072	.076	-.27	6.93
	50%	-4.333*	1.072	.016	-7.93	-.73
	75%	-9.333*	1.072	.000	-12.93	-5.73
	Kontrol Positif	-10.333*	1.072	.000	-13.93	-6.73
	Kontrol Negatif	12.000*	1.072	.000	8.40	15.60
50%	12,5%	7.667*	1.072	.000	4.07	11.27
	25%	4.333*	1.072	.016	.73	7.93
	75%	-5.000*	1.072	.006	-8.60	-1.40
	Kontrol Positif	-6.000*	1.072	.001	-9.60	-2.40
	Kontrol Negatif	16.333*	1.072	.000	12.73	19.93
75%	12,5%	12.667*	1.072	.000	9.07	16.27
	25%	9.333*	1.072	.000	5.73	12.93
	50%	5.000*	1.072	.006	1.40	8.60
	Kontrol Positif	-1.000	1.072	.930	-4.60	2.60
	Kontrol Negatif	21.333*	1.072	.000	17.73	24.93
Kontrol Positif	12,5%	13.667*	1.072	.000	10.07	17.27
	25%	10.333*	1.072	.000	6.73	13.93
	50%	6.000*	1.072	.001	2.40	9.60
	75%	1.000	1.072	.930	-2.60	4.60
	Kontrol Negatif	22.333*	1.072	.000	18.73	25.93
Kontrol Negatif	12,5%	-8.667*	1.072	.000	-12.27	-5.07
	25%	-12.000*	1.072	.000	-15.60	-8.40
	50%	-16.333*	1.072	.000	-19.93	-12.73
	75%	-21.333*	1.072	.000	-24.93	-17.73
	Kontrol Positif	-22.333*	1.072	.000	-25.93	-18.73

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

Diameter Zona Hambat Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

Tukey HSD^a

Konsentrasi Ekstrak Etanolik Daun Kenikir	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol Negatif	3	.00			
12,5%	3		8.67		
25%	3		12.00		
50%	3			16.33	
75%	3				21.33
Kontrol Positif	3				22.33
Sig.		1.000	.076	1.000	.930

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Untuk melihat kesamaan rata-rata maka menggunakan output Tukey HSD.

Pada subset 2 didapatkan data konsentrasi ekstrak etanolik daun kenikir tersebut tidak mempunyai perbedaan yang signifikan, maka rata-rata konsentrasi ekstrak etanolik daun kenikir pada konsentrasi 12,5% dan 25% adalah sama. Pada subset 4 didapatkan data konsentrasi ekstrak etanolik daun kenikir tersebut tidak mempunyai perbedaan yang signifikan, maka rata-rata konsentrasi ekstrak etanolik daun kenikir pada konsentrasi 75% dan kontrol positif adalah sama.