

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



Oleh :

**Kartika Nur Astana
19133959A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

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

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
Derajat sarjana farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi Pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh :

**Kartika Nur Astana
19133959A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul :

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

Oleh :

Kartika Nur Astana
19133959A

Dipertahankan di hadapan panitia penguji skripsi

Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi

Pada tanggal : 16 Juli 2018

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan,

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

Pembimbing,

Dr. Ana Indrayati, M. Si.

Pembimbing Pendamping,

Vivin Nopiyanti, S. Farm., M. Sc., Apt.

1 Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt.

2 Ismi Rahmawati, M.Si., Apt.

3 Hery Muhammad Ansory, S. Pd., M. Sc.

4 Dr. Ana Indrayati, M. Si.

PERNYATAAN

PERNYATAAN

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

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

Surakarta, Juli 2018



Kartika Nur Astana

HALAMAN PERSEMBAHAN

"Apa arti ijazah yang bertumpuk, jika kepedulian dan kepekaan tidak ikut dipupuk? Apa gunanya sekolah tinggi-tinggi jika hanya memperkaya sanak diri dan famili?"

-Najwa Shihab-

"Tanpa cinta, kecerdasan itu berbahaya. Dan tanpa kecerdasan, cinta itu tidak cukup. "

-Prof. Dr. Ir. B. J. Habibie-

Skripsi ini saya persembahkan kepada :

1. Bawono dan Widi Astuti, orang tua tercinta yang semoga di setiap tetes keringat keikhlasan dan lelah kerelaannya digantikan surga oleh Allah SWT.
2. Surya Astana dan Kartika Mandasari, kakak tercinta yang selalu mendukung dan memberikan semangat.
3. Wahyu Fery Setiadi yang sudah menjadi definisi dari rumah itu sendiri.
4. Tina Nur Vita Sari, Aminudin Aditya Pamungkas, Fytriana Sari, Fitria Toki Riswiani, teman yang selalu ada dan memberikan dukungan serta doa.
5. Dewi Oktavia, Yovita Astri Ningrum, Karunia Chrissnatali, sahabat terkasih yang mengajarkan saya untuk terus maju dan pantang menyerah sebelum mencoba.
6. Seluruh teman-teman yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu disini, namun akan selalu saya ingat kebaikan hatinya.
7. Almamater, Bangsa, dan Negara yang saya banggakan.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas maghfirah dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP *Staphylococcus aureus* YANG RESISTEN”**. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

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

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA, selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. DR. R.A. Oetari, SU., MM., Apt, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Lucia Vita Inandha Dewi, S. Si., M. Sc., Apt, selaku pembimbing akademik yang senantiasa membimbing dan memberi nasehat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si, selaku pembimbing utama yang telah berkenan mengorbankan waktunya guna membimbing, memberi nasehat, dan mengarahkan penulis pada saat penelitian dan penyusunan skripsi.
5. Vivin Nopiyanti, S. Farm., M. Sc., Apt, selaku pembimbing pendamping yang selalu mendukung, membimbing dan memberikan semangat kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Dr. Titik Sunarni, M. Si., Apt, selaku penguji pertama yang telah bersedia meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan saran serta masukan yang membangun untuk memperbaiki skripsi ini.
7. Ismi Rahmawati, M. Si., Apt, selaku penguji kedua yang telah bersedia meluangkan waktu dan memberikan saran serta masukan yang membangun untuk memperbaiki skripsi ini.

8. Hery Muhammad Ansory, S. Pd., M. Sc, selaku penguji ketiga yang telah bersedia meluangkan waktu dan memberikan saran serta masukan yang membangun untuk memperbaiki skripsi ini.
9. Seluruh Dosen, Asisten Dosen, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi.
10. Seluruh Staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.

Akhir kata penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan oleh karena itu, penulis menerima kritikan atau saran yang bersifat membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan di bidang ilmu farmasi khususnya obat tradisional Indonesia.

Surakarta, Juli 2018

Kartika Nur Astana

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i

PENGESAHAN SKRIPSI

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul :

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

Oleh :

Kartika Nur Astana
19133959A

Dipertahankan di hadapan panitia penguji skripsi

Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi

Pada tanggal : 16 Juli 2018

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan,

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

Pembimbing,

Dr. Ana Indrayati, M. Si.

Pembimbing Pendamping,

Vivin Nopiyanti, S. Farm., M. Sc., Apt.

1 Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt.

2 Ismi Rahmawati, M.Si., Apt.

3 Hery Muhammad Ansory, S. Pd., M. Sc.

4 Dr. Ana Indrayati, M. Si.

.....ii

PERNYATAAN

PERNYATAAN

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

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

Surakarta, Juli 2018


Kartika Nur Astana

.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
INTISARI.....	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1

B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Tanaman Belimbing Wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> L.).....	5
1. Sistematika tanaman.....	5
2. Nama lain	5
3. Morfologi tanaman.....	6
4. Kandungan kimia	6
4.1. Flavonoid.	7
4.2. Saponin.	8
4.3. Tanin.....	8
5. Manfaat tanaman belimbing wuluh.....	8
B. Simplisia	9
1. Pengertian simplisia	9
2. Pencucian dan pengeringan simplisia.....	9
C. Metode Penyarian	10
1. Ekstraksi	10
2. Maserasi.....	11
3. Fraksinasi.....	11
4. Pelarut.....	11
4.1. Etanol.....	12
4.2. <i>n</i> -Heksan.....	12
4.3. Etil Asetat.	12
4.4. Air.....	13
D. Media.....	13
E. Sterilisasi	14
F. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1. Sistematika.....	15
2. Morfologi dan identifikasi	15
3. Patogenesis.....	16
4. <i>Staphylococcus aureus</i> yang resisten	16
G. Aktivitas Antibakteri.....	17
1. Antibakteri	17
2. Mekanisme kerja antibakteri.....	17
3. Mekanisme resistensi	18
4. Resistensi terhadap betalaktam	20
H. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri.....	22
I. Vankomisin.....	23
J. Landasan Teori.....	24
K. Hipotesis	26
BAB III METODE PENELITIAN	27
A. Populasi dan Sampel	27
1. Populasi	27

2. Sampel	27
B. Variabel Penelitian	27
1. Identifikasi variabel utama	27
2. Klasifikasi variabel utama	27
3. Definisi operasional variabel utama	28
C. Alat dan Bahan.....	30
1. Alat	30
2. Bahan.....	30
2.1 Bahan sampel.	30
2.2 Bahan kimia.	30
D. Jalannya Penelitian.....	30
1. Determinasi daun belimbing wuluh	30
2. Pengambilan sampel.....	31
3. Pembuatan serbuk daun belimbing wuluh.....	31
4. Susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh	31
5. Pembuatan ekstrak etanol	31
6. Tes bebas etanol daun belimbing wuluh	32
7. Fraksinasi.....	32
8. Identifikasi kandungan senyawa kimia	32
8.1 Identifikasi flavonoid.	32
8.2 Identifikasi saponin.	32
8.3 Identifikasi tanin.	33
9. Sterilisasi.....	33
10. Pembuatan suspensi bakteri uji	33
11. Identifikasi bakteri uji <i>S. aureus</i> yang resisten	33
11.1 Identifikasi morfologi koloni dengan media VJA.....	33
11.2 Pewarnaan Gram.	34
11.3 Identifikasi biokimia	34
11.4 Uji hemolisis.	34
11.5 Uji sensitivitas <i>S. aureus</i> ATCC 25923 dan <i>S. aureus</i> yang resisten terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin dan vankomisin.....	35
12. Pengujian aktivitas antibakteri.....	35
13. Analisis Data.....	36
 BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	 41
A. Hasil Penelitian.....	41
1. Identifikasi Tanaman Belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> L.)	41
2. Pengumpulan bahan dan pengeringan	41
3. Pembuatan serbuk daun belimbing wuluh	42
4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh ..	42
5. Pembuatan ekstrak etanol daun belimbing wuluh.....	43
6. Tes bebas etanol ekstrak maserasi daun belimbing wuluh	44
7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh	45

8. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh....	45
9. Identifikasi bakteri uji <i>S. aureus</i> yang resisten	46
10. Uji sensitivitas <i>S. aureus</i> yang resisten terhadap antibiotik .	48
11. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun belimbing wuluh.....	50
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	56
A. Kesimpulan	56
B. Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA	57

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Belimbing Wuluh(<i>Averrhoa bilimbi</i> L.)	5
Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun belimbing wuluh	38
Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi	39
Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh terhadap <i>S. aureus</i> yang resisten dengan metode dilusi	40

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1.	Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh	42
Tabel 2.	Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh	43
Tabel 3.	Rendemen ekstrak etanol daun belimbing wuluh.....	44
Tabel 4.	Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi daun belimbing wuluh.....	44
Tabel 5.	Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun belimbing wuluh secara kualitatif	45
Tabel 6.	Rendemen fraksinasi ekstrak etanolik daun belimbing wuluh.....	46
Tabel 7.	Hasil identifikasi bakteri dengan uji katalase dan koagulase	48
Tabel 8.	Hasil uji sensitivitas MRSA terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin, dan vankomisin.....	49
Tabel 9.	Uji aktivitas antibakteri.....	50
Tabel 10.	Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri <i>S. aureus</i> yang resisten dengan metode dilusi.....	53

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman belimbing wuluh	63
Lampiran 2. Tanaman dan serbuk daun belimbing wuluh	64
Lampiran 3. Serangkaian proses maserasi	65
Lampiran 4. Penetapan kadar air serbuk daun belimbing wuluh dan uji bebas etanol ekstrak belimbing wuluh.....	67
Lampiran 5. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh.....	68
Lampiran 6. Fraksinasi <i>n</i> -heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air	69
Lampiran 7. Ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air	70
Lampiran 8. Hasil identifikasi makroskopis, mikroskopis, uji biokimia dan uji hemolisis bakteri <i>S. aureus</i> yang resisten	71
Lampiran 9. Gambar uji sensitivitas <i>S. aureus</i> yang resisten terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin, vankomisin dan uji sensitivitas <i>S. aureus</i> terhadap antibiotik oksasilin dan sefoksitin	72
Lampiran 10. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap <i>S. aureus</i> yang resisten dan <i>S. aureus</i> secara difusi	73
Lampiran 11. Gambar hasil dilusi dan inokulasi ekstrak etanol dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh terhadap <i>S. aureus</i> resisten	75
Lampiran 12. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh, persen rendemen kadar lembab serbuk, persen rendemen ekstrak daun belimbing wuluh persen rendemen fraksi daun belimbing wuluh ...	77
Lampiran 13. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat, dan air metode difusi.....	79
Lampiran 14. Pembuatan konsentrasi fraksi etil asetat metode dilusi	81
Lampiran 15. Formulasi dan pembuatan media	82

DAFTAR SINGKATAN

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CO ₂	Karbon dioksida
DNA	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
FeCl ₃	Ferri Klorida
HCl	Asam Hidroklorida
H ₂ SO ₄	Asam Sulfat
H ₂ O	Dihidrogen oksida
KBM	Konsentrasi Bunuh Minimum
KHM	Konsentrasi Hambat Minimum
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
Mg	Magnesium
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
VJA	<i>Vogel Johnson Agar</i>
MHA	<i>Mueller Hinton Agar</i>
UV	Ultraviolet

INTISARI

ASTANA KN., 2018, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *N*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP *Staphylococcus aureus* YANG RESISTEN. SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Staphylococcus aureus yang resisten adalah bakteri *S. aureus* yang mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan beta laktam. Tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) sering digunakan sebagai obat tradisional. Daun belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin dan tanin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap *S. aureus* yang resisten.

Serbuk daun belimbing wuluh diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, kemudian difraksinasi menggunakan pelarut fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air yang berbeda polaritasnya. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi dan dilusi. Konsentrasi yang digunakan dalam metode difusi 60%, 50%, 40%, 30%, 20% dan 10% bertujuan untuk mengetahui fraksi teraktif. Fraksi teraktif kemudian dilakukan uji dilusi untuk mengetahui KBM menggunakan konsentrasi 60%, 30%, 15%, 7,5%, 3,75%, 1,88%, 0,94% dan 0,47%. Analisis kandungan golongan senyawa fraksi etil asetat dilakukan secara KLT dan menunjukkan adanya flavonoid, saponin dan tanin.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua fraksi dan ekstrak mempunyai aktivitas antibakteri. Fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dengan diameter hambat 11 mm pada konsentrasi 60%. Hasil uji dilusi fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas antibakteri dengan KBM 15%.

Kata kunci : Daun belimbing wuluh, fraksinasi, *Staphylococcus aureus* yang resisten.

ABSTRACT

ASTANA KN., 2018 ANTIBACTERIA ACTIVITY TEST OF FRACTION *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE AND WATER OF ETHANOL EXTRACT WULUH STAR FRUIT LEAVES (*Averrhoa bilimbi* L.) TO *Resistant Staphylococcus aureus*, THESIS, PHARMACY FACULTY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA

Resistant Staphylococcus aureus is an *S. aureus* bacterium experiencing resistance towards antibiotic beta lactam group. Wuluh star fruit leaves (*Averrhoa bilimbi* L.) is used as a traditional medicine. Wuluh star fruit leaves contains flavonoid, saponin and tanin. This study aims to determine the antibacterial activity of the fraction of *n*-hexane, ethyl acetate and water from wuluh star fruit leaves ethanolic extract against *Resistant S. aureus*.

Wuluh star fruit leaves powder was extracted by maserasi method by ethanolic 70%, and then it was fractionated by solvent *n*-hexane, ethyl acetate and water which have different polarity. Antibacterial activity test was performed using diffusion and dilution methods. The concentration used in the diffusion method was 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, and 10% aimed to determine the most active fraction. The most active fraction is continued dilution test to determine the MBC with concentration 60%, 30%, 7,5%, 3,75%, 1,88%, 0,94% and 0,47%. Analysis contents of the compounds in the ethyl acetate fraction use TLC showed flavonoid, saponin and tanin.

The results shows that all the fractions and extracts has antibacterial activity. Ethyl acetate fraction is most active fraction with 11 mm concentration of 60%. Dilution test results ethyl acetate fraction showed antibacterial activity with MBC 15%.

Keywords : *Averrhoa bilimbi* L., fractionation, *Resistant Staphylococcus aureus*.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi masih merupakan penyebab utama tingginya angka kesakitan (*morbidity*) dan angka kematian (*mortality*) di Indonesia (Darmadi 2008). Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri. Bakteri merupakan mikroorganisme yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang, tetapi hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop contohnya *Staphylococcus aureus*, bakteri patogen yang dapat menimbulkan infeksi dan kelainan pada kulit (Radji 2010). *S. aureus* merupakan bakteri flora normal pada kulit dan selaput lendir pada manusia. Bakteri ini dapat menjadi penyebab infeksi baik pada manusia maupun pada hewan dan mengakibatkan kerusakan pada kulit atau luka pada organ tubuh jika bakteri ini mengalahkan mekanisme pertahanan tubuh. Saat bakteri masuk ke peredaran darah bakteri dapat menyebar ke organ lain dan menyebabkan infeksi (Anwar 1994).

S. aureus memiliki kemampuan menjadi resisten terhadap antibiotika. *S. aureus* yang telah resisten disebut *Resistant S. aureus* (Kusuma 2009). Berdasarkan penelitian yang baru-baru ini dilakukan di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang terhadap beberapa spesimen klinik seperti, pus, sputum, dan urin didapatkan 772 isolat *S. aureus*, 38,2% diantaranya merupakan isolat MRSA. Prevalensi tertinggi didapatkan pada tahun 2012 sebesar 43,5%, sedangkan prevalensi terendah pada tahun 2013 sebesar 33,5% (Erikawati *et al* 2016).

Pelayanan kesehatan dengan pemakaian herbal dalam 20 tahun terakhir ini menjadi perhatian dunia karena pemakaian obat-obatan tradisional yang terus meningkat, hal ini disebabkan karena penggunaan obat-obatan tradisional telah diterima luas di negara-negara maju maupun berkembang sejak dahulu kala (Depkes RI 2007) dan pengetahuan tentang cara penyembuhan terhadap penyakit yang dilakukan oleh nenek moyang zaman dahulu sebenarnya sangat bermanfaat dan aman bagi kesehatan (Hariana 2008).

Indonesia kaya akan berbagai keanekaragaman hayati yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat atau bahan baku obat, hal tersebut juga didukung dengan penelitian ilmiah tentang tumbuhan yang secara fungsional tidak lagi dipandang sebagai bahan konsumsi maupun penghias saja, tetapi juga sebagai tanaman obat yang multi fungsi (Fajiriah *et al* 2007).

Salah satu tanaman yang mempunyai potensi sebagai obat alami adalah tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). Daun belimbing wuluh mengandung senyawa jenis flavonoid seperti luteolin dan apigenin (Zakaria *et al* 2007). Tanaman belimbing wuluh dapat dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari. Bagian yang dapat digunakan diantaranya bunga, buah, daun, dan batangnya. Bunga belimbing wuluh dapat digunakan sebagai obat batuk dan sariawan. Buah belimbing wuluh selain digunakan sebagai bumbu masak dapat juga digunakan sebagai obat menurunkan tekanan darah tinggi, gusi berdarah, jerawat dan batuk. Batang belimbing wuluh dapat digunakan sebagai obat sakit perut, sedangkan daunnya selain dapat digunakan sebagai penyedap rasa juga dapat digunakan sebagai obat batuk, obat kompres pada sakit gondokan, obat rematik, obat diare dan juga berpotensi sebagai antibakteri (Sudarsono *et al* 2007).

Penelitian sebelumnya telah dilakukan oleh Nur Azmi (2013) menunjukkan bahwa ekstrak etanol bunga belimbing wuluh menunjukkan aktivitas antibakteri dengan daerah hambat yang efektif terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 200 mg/mL yaitu 15,82 mm dan terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada konsentrasi 200 mg/mL yaitu 14,73 mm. Fraksi *n*-heksan memberikan daerah hambat yang kurang efektif terhadap kedua bakteri, sedangkan fraksi etil asetat memberikan daerah hambat yang efektif terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 200 mg/mL yaitu 15,5 mm dan terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada konsentrasi 200 mg/mL yaitu 14,5 mm dan pada fraksi air memberikan daerah hambat yang kurang efektif terhadap kedua bakteri. Penelitian lain yang dilakukan oleh (Pendit *et al*) menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh dengan perbandingan bahan : pelarut (b/v) 1 : 5 merupakan perlakuan terbaik karena memiliki nilai parameter rendemen sebesar 10,45% dan aktivitas antibakteri

terhadap *S. aureus* sebesar 13,13 mm (Pendit *et al* 2016). Uji ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh terhadap bakteri MRSA telah dilakukan oleh Ani Wijayanti (2017), berdasarkan hasil yang diperoleh diketahui bahwa ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 40% dan 60% mampu memberikan zona hambat sebesar 9,3 mm dan 11 mm.

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi yang dilanjutkan dengan fraksinasi. Pelarut yang digunakan pada metode maserasi adalah etanol 70%, karena hampir semua komponen aktif dari tanaman seperti flavonoid, terpenoid, dan minyak atsiri dapat larut dalam etanol (Tiwari *et al* 2011). Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan golongan utama kandungan satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya dan memperoleh senyawa dalam jumlah maksimal. Pelarut yang digunakan pada proses fraksinasi adalah pelarut *n*-heksan yang dapat menyari senyawa kimia yang bersifat nonpolar yaitu steroid, triterpenoid, serta karotenoid. Pelarut etil asetat bersifat semipolar yang dapat menarik senyawa kimia yaitu flavonoid, alkaloid, dan senyawa-senyawa fenol, sedangkan pelarut air yang bersifat polar dapat menarik senyawa kimia yaitu glikosida, minyak menguap, lendir, peptida, dan asam organik. Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode difusi dan dilusi, dimana metode ini digunakan untuk melihat adanya Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada bakteri uji.

B. Perumusan Masalah

Rumusan permasalahan dalam penelitian ini adalah :

Pertama, apakah fraksi *n*-heksan, etil asetat, air, dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* yang resisten?

Kedua, manakah di antara ketiga fraksi (*n*-heksan, etil asetat, air) ekstrak etanol daun belimbing wuluh yang paling aktif sebagai antibakteri terhadap *S. aureus* yang resisten?

Ketiga, berapakah Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari fraksinasi *n*-heksan, etil asetat, air, dan ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap *S. aureus* yang resisten?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

Pertama, untuk mengetahui fraksi aktif hasil fraksinasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* yang resisten.

Kedua, untuk mengetahui fraksi dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh yang menghasilkan aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *S. aureus* yang resisten.

Ketiga, untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang dihasilkan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap *S. aureus* yang resisten.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan gambaran dan informasi kepada masyarakat tentang aktivitas daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) sebagai antibakteri, khususnya terhadap bakteri *S. aureus* yang resisten, sehingga dapat digunakan sebagai obat tradisional yang mudah penggunaannya, efektif, murah dan dapat bermanfaat di dunia kesehatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

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

1. Sistematika tanaman

Klarifikasi secara lengkap tanaman belimbing wuluh dalam taksonomi adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Sub Kingdom : Tracheobionta
Super Divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Sub Kelas : Rosidae
Ordo : Geraniales
Famili : Oxalidaceae
Genus : Averrhoa
Spesies : *Averrhoa bilimbi* L. (Soenarjono 2008).



Gambar 1. Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

2. Nama lain

Di Indonesia, tanaman belimbing wuluh memiliki nama berbeda-beda tiap daerahnya, seperti di Aceh belimbing wuluh dikenal dengan nama limeng,

selimeng, thimeng, di Batak dikenal dengan asom, belimbing, balimbingan, di Nias dikenal dengan malimbi, di Minangkabau dikenal dengan balimbieng, di Lampung dikenal dengan balimbing, di Sunda dikenal dengan calincing, balingbing, di Jawa dikenal dengan belimbing wuluh, di Madura bhalingbhing bulu, di Bali blimbing buloh, di Bugis celene (Wijayakusuma 2005).

3. Morfologi tanaman

Tanaman belimbing wuluh merupakan tanaman dengan pohon kecil, tinggi mencapai 10 m dengan batang tidak begitu besar dan mempunyai garis tengah hanya sekitar 30 cm. Ditanam sebagai pohon buah, kadang tumbuh liar dan ditemukan dari dataran rendah sampai 500 mdpl. Pohon yang berasal dari Amerika tropis ini menghendaki tempat tumbuh tidak ternaungi dan cukup lembab. Belimbing wuluh mempunyai batang kasar berbenjol-benjol, percabangan sedikit, arahnya condong ke atas. Cabang muda berambut halus seperti beludru, berwarna coklat muda. Daun berupa daun majemuk menyirip ganjil dengan 21-45 pasang anak daun. Anak daun bertangkai pendek bentuknya bulat telur, ujung runcing, pangkal membundar, tepi rata, panjang 2-10 cm, lebar 1-3 cm, berwarna hijau, permukaan bawah hijau muda. Perbungaan berkelompok, keluar dari batang atau percabangan yang besar, bunga kecil-kecil berbentuk bintang dengan warna ungu kemerahan (Wijayakusuma 2005).

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

4. Kandungan kimia

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

asam format, dan kalium sitrat (Wijayakusuma 2006). Penelitian Anggraeni (2012) menunjukkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin dan tanin.

4.1. Flavonoid. Flavonoid adalah senyawa polifenol yang banyak terdapat di alam. Flavonoid merupakan golongan senyawa bahan alam dari senyawa fenolik yang banyak sebagai pigmen tumbuhan. Flavonoid terdapat pada grup-grup pada unsur-unsur polifenol yang terdapat pada kebanyakan tumbuhan, biji, kulit buah, kulit kayu, dan bunga. Sejumlah besar tumbuhan obat mengandung flavonoid, flavon, flavanon, isoflavon, antosianidin, dan khalkon (Robinson 1991).

Kebanyakan flavonoid terdapat dalam buah, sayuran, dan minuman (teh, kopi, bir, anggur, dan minuman buah). Di alam, senyawa fenolik kerap dijumpai terikat pada protein, alkaloid, dan terdapat diantara terpenoid (Robinson 1991). Flavonoid juga berpengaruh terhadap metabolisme kolesterol secara langsung di hepar. Hipotesis yang mendukung berupa menurunnya serum kolesterol dan aktivitas *hydroxymethylglutary-CoA reductase* dan *enzyme sterol O acyltransferase-2* pada metabolisme kolesterol setelah pemberian flavonoid pada tikus (Kurnia *et al* 2010).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dapat dibagi menjadi tiga yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme antibakteri flavonoid dalam menghambat sintesis asam nukleat adalah cincin A dan B yang memegang peran penting dalam proses interaksi atau ikatan hidrogen dengan menumpuk basa pada asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA. Dihidroksilasi pada cincin A berperan penting pada aktivitas antibakteri flavonoid. Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri. Kedua, mekanisme antibakteri flavonoid dengan cara menghambat fungsi membran sel yaitu dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Ketiga, mekanisme antibakteri flavonoid

dengan cara menghambat metabolisme energi yaitu dengan menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid menghambat sitokrom C reduktase sehingga pembentukan metabolisme dan biosintesis makromolekuler terhambat (Cushnie 2005).

4.2. Saponin. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Terdapat dua jenis saponin yaitu triterpenoid alkohol dan glikosida struktur steroid tertentu yang mempunyai rantai samping spiroketal. Saponin bersifat spermisida, antimikroba, antiperadangan dan memiliki aktivitas sitotoksik (Tjay dan Rahardja 2002).

4.3. Tanin. Tanin merupakan kandungan tumbuhan yang bersifat fenol, yang mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Kelarutan tanin adalah larut dalam air, tidak larut dalam larutan organik non polar. Tanin yang terkandung di bagian daun belimbing wuluh mampu mengurangi penyerapan makanan dengan cara mengendapkan mukosa protein yang ada dalam permukaan usus (Robinson 1995).

Tanin di dalam tubuh akan berikatan dengan protein tubuh dan akan melapisi dinding usus, sehingga penyerapan lemak dihambat. Selain itu, tanin melindungi usus terhadap asam lemak tak jenuh. Proses perlindungan yang dilakukan tanin berupa pematatan lapisan lender saluran pencernaan sehingga menghambat penyerapan zat-zat makanan (termasuk lemak dan kolesterol) oleh saluran pencernaan. Penelitian tanin diketahui memacu glukosa dan lemak, sehingga timbunan kedua sumber kalori ini dalam darah dapat dihindari, artinya kolesterol dan gula darah dapat turun (Kurnia *et al* 2010).

5. Manfaat tanaman belimbing wuluh

Tanaman belimbing wuluh mempunyai banyak khasiat dan kegunaan mulai dari batang, daun, bunga, dan buah (Depkes 1989). Batang belimbing wuluh dapat digunakan untuk mengobati penyakit gondok. Daun belimbing wuluh yang dilumatkan digunakan untuk mengatasi demam dan obat luar, rebusan daun untuk menanggulangi peradangan usus besar dan mengobati diabetes mellitus. Gerusan tangkai muda sebagai obat oles pada sakit gondokan. Daun mudanya

yang dicampur beberapa rempah-rempah dapat digunakan sebagai obat encok, gondong (parotitis), sakit perut, tekanan darah tinggi dan rematik. Cairan dari bunga untuk obat batuk dan sariawan. Buah dapat menurunkan tekanan darah, sakit gigi berlubang, jerawat, panu, kelumpuhan, gangguan pencernaan, tekanan darah tinggi dan radang rektum. Buah yang dibuat selai untuk penderita sariawan usus dan memperlancar pengeluaran getah empedu yang kurang baik (Sudarsono *et al* 2012).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga, kecuali dinyatakan lain simplisia berupa bahan yang dikeringkan (FI Edisi III 1979). Simplisia dapat dibagi menjadi tiga golongan yaitu simplisia nabati, hewani dan pelikan atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan ialah isi sel yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau isi sel yang dengan cara tertentu dikeluarkan selnya, atau senyawa nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia yang belum berupa zat kimia murni (Depkes 2000).

2. Pencucian dan pengeringan simplisia

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

Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama dan untuk menjamin keawetan dan mencegah timbulnya bakteri serta jamur. Pengeringan secara alamiah dapat dilakukan dengan panas sinar matahari langsung. Cara ini dilakukan untuk mengeringkan bagian tanaman yang relatif keras seperti kayu,

biji dan simplisia dengan kandungan senyawa aktif yang relatif stabil apabila terkena panas.

Pengeringan alamiah lainnya adalah dengan cara diangin-anginkan dan tidak dipanaskan di bawah sinar matahari langsung. Cara ini terutama untuk mengeringkan bagian tanaman yang lunak seperti bunga dan daun. Pengeringan simplisia yang dilakukan menggunakan alat pengering yang harus diperhatikan adalah jenis bahan, suhu pengeringan, dan waktu pengeringan, sehingga simplisia tidak mudah rusak dan kandungan kimia yang berkhasiat tidak berubah karena proses fermentasi (Gunawan dan Mulyani 2004).

C. Metode Penyarian

1. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes 2000). Ekstraksi merupakan pemisahan secara kimia dan fisika suatu bahan padat atau bahan cair dari suatu padatan tanaman obat. Pemilihan pelarut sangat penting dalam proses ekstraksi sehingga bahan berkhasiat yang akan ditarik secara sempurna (Farouq 2003). Metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut dibedakan menjadi dua macam yaitu cara dingin dan panas. Cara dingin terdiri dari maserasi dan perkolasi sedangkan cara panas terdiri dari refluks, sokletasi, digesti dan infus (Depkes 2000).

Ekstrak tumbuhan obat yang dibuat dari simplisia nabati dapat dipandang sebagai bahan awal, bahan antara atau bahan produk jadi. Ekstrak sebagai bahan awal dianalogkan dengan komoditi bahan baku obat yang dengan teknologi fitofarmasi diproses menjadi produk jadi. Ekstrak sebagai bahan antara berarti masih menjadi bahan yang dapat diproses lagi menjadi fraksi-fraksi, isolat senyawa tunggal dan sebagai campuran dengan ekstrak lain. Ekstrak sebagai produk jadi berarti ekstrak yang berada dalam sediaan obat jadi siap digunakan oleh penderita (Depkes 2000).

2. Maserasi

Maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Proses maserasi diawali dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari sampai meresap dan pelunakan susunan sel sehingga zat-zat akan terlarut, selanjutnya rendaman tersebut disimpan agar terlindung dari cahaya matahari langsung (mencegah terjadinya reaksi katalis akibat cahaya dan terjadinya perubahan warna) kemudian dikocok kembali (Voight 1994).

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 1 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok, dimasukkan dalam bejana lalu dituangi dengan 7 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 2 hari terlindungi dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk, sari kemudian diencerkan dan ampas diperas. Ampas dicuci dngan cairan penyari sebanyak 3 bagian hingga diperoleh 100 bagian. Keuntungan metode maserasi adalah alat yang digunakan sederhana, murah dan mudah dilakukan (Depkes 2000).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu cara untuk memisahkan golongan utama kandungan berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan terjadi fraksi yang berbeda-beda. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar dan senyawa semi polar akan masuk ke pelarut semi polar (Harborne 2006). Secara sederhana fraksinasi dilakukan dengan menggunakan corong pisah yang dimasukkan dua pelarut yang masing-masing mempunyai kelarutan terbatas dalam pelarut pasangannya (misalnya eter dan air), maka senyawa terdistribusi atau terpartisi di antara kedua cairan itu. Partisi ini merupakan persaingan antara kelarutan dalam cairan (Gritter *et al* 1991).

4. Pelarut

Pelarut adalah suatu zat untuk melarutkan suatu obat dalam preparat larutan. Pemilihan pelarut yang akan digunakan dalam ekstraksi dari bahan mentah obat tertentu berdasarkan daya larut zat aktif dan zat yang tidak aktif (Ansel 2005). Pemilihan pelarut harus mempertimbangkan banyak faktor. Kriteria cairan penyari yang baik yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan

kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, tidak mempengaruhi zat yang berkhasiat, diperbolehkan oleh peraturan, dan selektif (hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki) (Agoes 2007). Cairan penyari atau pelarut ada tiga macam yaitu pelarut polar, semi polar dan non polar, contoh cairan penyari adalah air, etanol, etanol-air dan air (Depkes 2000).

Penyarian ekstrak daun belimbing wuluh dalam penelitian ini menggunakan metode ekstraksi dengan pelarut etanol 70% dan difraksinasi dengan *n*-heksan, etil asetat, dan air. Penggunaan pelarut yang berbeda polaritasnya disebabkan kandungan kimia senyawa daun belimbing wuluh sehingga dilakukan fraksinasi akan diketahui fraksi yang paling efektif terhadap MRSA.

4.1. Etanol. Etanol adalah pelarut serbaguna untuk ekstraksi pendahuluan. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, pelarut ini tidak menyebabkan pembengkakan membran sel, memperbaiki stabilitas bahan obat pelarut. Keuntungan lainnya adalah sifat untuk menghambat kerja enzim. Etanol 70% biasanya menghasilkan suatu bagan aktif yang optimal, dimana bahan pengotornya hanya dalam skala kecil larut dalam cairan pengekstraksinya (Voight 1994). Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kumarin, flavonoid, antrakuinon, steroid, dan klorofil. Etanol di pertimbangkan sebagai larutan penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman kulit tidak dapat tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorbsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air pada skala perbandingan, panas diperlukan lebih sedikit (Depkes 2005).

4.2. *n*-Heksan. Pelarut *n*-heksan adalah pelarut non polar berupa cairan jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar dan mempunyai bau seperti eter atau petroleum, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksan yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti terpenoid, triterpenoid, sterol, lemak, asam lemak, alkaloid, karotenoid, klorofil dan resin (Depkes 2005).

4.3. Etil Asetat. Merupakan pelarut semi polar, mudah terbakar, dan menguap (Depkes 1979). Etil asetat merupakan suatu cairan jernih, tidak

berwarna, bau khas seperti buah, larut dalam 15 bagian air, dapat bercampur dengan eter, etanol, dan kloroform. Senyawa yang larut ke dalam pelarut ini adalah glikon maupun aglikon, flavonoid, alkaloid, polifenol, air hingga 3% (Harborne 2006).

4.4. Air. Air adalah pelarut yang sangat polar digunakan untuk menyari senyawa-senyawa organik polar sehingga cocok untuk pelarut polar dalam proses fraksinasi. Pelarut air dipilih karena air dapat melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tannin, gula, gom, pati, protein, enzim, pektin, zat warna asam organik. Kekurangan menggunakan air adalah zat aktif yang tersari juga zat lain yang tidak diperlukan atau bahkan dapat menggunakan proses pembuatan sari seperti gom, pati, protein, lemak, enzim dan lain-lain. Air juga merupakan tempat tumbuh bagi kuman, kapang, dan khamir. Air digunakan sebagai pelarut karena murah, mudah diperoleh, stabil, tidak menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah (Depkes 2005).

D. Media

Media adalah tempat mikroba untuk tumbuh karena menyediakan berbagai bahan yang diperlukan mikroba untuk hidup dan memperbanyak diri. Mikroba dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik, jika di dalam media 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 mikroba lain (Abdurahman 2008).

Bentuk media ditentukan oleh ada tidaknya penambahan zat pematik seperti agar-agar, gelatin, dan sebagainya. Media padat adalah media yang ditambahkan antara 12-15 g tepung agar-agar per 1000 mL media. Jumlah tepung agar yang ditambahkan tergantung pada jenis dan kelompok mikroba yang digunakan. Jenis media yang memerlukan kadar air tinggi maka jumlah tepung

agar-agar harus kecil, tetapi untuk jenis media yang memerlukan kandungan air rendah maka penambahan tepung harus banyak. Media padat umumnya digunakan untuk bakteri, ragi, jamur, dan kadang-kadang mikroalga.

Media cair apabila ke dalam media tidak ditambahkan zat pematat, biasanya media cair digunakan untuk perbaikan mikroalga dan juga mikroba lain, terutama bakteri dan ragi. Media semi cair atau semi padat apabila penambahan zat pematat hanya 25% atau kurang dari yang seharusnya. Umumnya diperlukan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup aerobik atau fakultatif (Suriawiria 2005).

E. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang dipergunakan dalam bidang mikrobiologi harus dalam keadaan steril. Sterilisasi merupakan proses untuk membunuh semua jasad renik yang ada, sehingga jika ditumbuhkan di dalam suatu medium tidak ada lagi jasad renik yang dapat berkembang biak. Sterilisasi dengan autoklaf biasanya disebut sterilisasi basah atau sterilisasi uap yang mudah diangkat dengan menggunakan uap air jenuh bertekanan pada suhu 121°C disebabkan oleh tekanan 1 atm. Metode selain dengan menggunakan sterilisasi basah juga dapat menggunakan metode lainnya seperti perebusan, tindalisasi, pasteurisasi, pemanasan kering, radiasi, radiasi ionisasi, penyaringan, dan lain-lain (Fardiza 2001).

Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah dan kering, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar x, sinar α , dan sinar UV untuk bahan yang tidak aktif akan berubah akibat temperatur tinggi atau tekanan tinggi. Sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin dan sterilisasi secara mekanik yaitu dengan penggunaan saringan atau filter untuk bahan yang akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi mengalami perubahan atau penguraian (Darmandi 2008).

F. *Staphylococcus aureus*

1. Sistematika

Menurut G. M. Garrity, *et al* (2007) sistematika ilmiah dari bakteri *S. aureus* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bakteria
Filum	: Firmicutes
Class	: Bacili
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2. Morfologi dan identifikasi

S. aureus adalah bakteri berbentuk bulat dengan diameter kira-kira 1,7-1,2 μm , dan biasanya hidup bergerombol seperti buah anggur. *S. aureus* tidak bergerak karena tidak mempunyai flagella dan tidak membentuk spora. *S. aureus* mudah tumbuh dalam keadaan aerobik maupun aerob fakultatif pada suhu optimum 37°C. Koloni pada medium padat berbentuk bulat, halus, menonjol dan berkilauan, membentuk pigmen berwarna kuning emas. *S. aureus* merupakan penyebab infeksi piogenik (menghasilkan pus) pada manusia. Dan bakteri ini dapat menyebabkan sepsis pada luka bedah, abses payudara, mata lengket, dan lesi-lesi kulit pada bayi (Jawetz *et al* 2005).

S. aureus dapat meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik sangat bervariasi, tetapi katalase dihasilkan secara tetap. *S. aureus* relatif resisten terhadap pengeringan dan terhadap panas (tahan pada suhu 50°C selama 30 menit). Banyak galur strain resisten terhadap penisilin karena membentuk penisilinase (beta-laktamase), suatu enzim yang merusak penisilin dengan memecahkan cincin beta-laktam. Pembentukannya diatur oleh plasmid yang dapat dipindahkan oleh bakteriofage melalui mekanisme transduksi. Plasmid juga membawa kontrol genetik resistensi terhadap antibiotika lainnya, misalnya tetrasiklin dan eritromisin.

S. aureus bersifat koagulase positif, yang membedakannya dari spesies yang lain. Protein yang menyerupai enzim yang membekukan plasma beroksalat atau bersitrat. *S. aureus* biasanya membentuk koloni berwarna abu-abu hingga kuning emas pekat. *S. aureus* tumbuh dengan mudah pada sebagian besar media bakteriologis dengan kondisi aerob atau mikroaerofilik, tumbuh paling cepat pada 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada temperatur ruang (20-25°C). Koloni pada media padat berbentuk bulat, halus, timbul, dan mengkilat (Jawetz *et al* 2012).

3. Patogenesis

S. aureus merupakan penyebab infeksi yang bersifat piogenik. Bakteri ini masuk ke dalam tubuh melalui folikel rambut, kelenjar keringat atau luka-luka kecil. *S. aureus* mempunyai sifat dapat menghemolisa darah, menghasilkan koagulasi, membentuk pigmen berwarna kuning emas, dan dapat memecah manitol menjadi asam. Infeksi yang ditimbulkan oleh *S. aureus* dapat meluas ke jaringan sekitarnya melalui darah dan limfe. Pernaahan yang bersifat menahun dan timbul radang yang disebut osteomielitis. Perluasan lain juga dapat sampai ke paru-paru, selaput otak dan sebagainya (Suryono 2007).

Infeksi oleh *S. aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses nanah. Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, phlebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomielitis, dan endokarditis. *S. aureus* juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik (Ryan *et al* 1994, Warsa 1994).

Kontaminasi langsung *S. aureus* pada luka terbuka (seperti luka paska bedah) atau infeksi setelah trauma (seperti osteomielitis kronis setelah fraktur terbuka) dan meningitis setelah fraktur tengkorak, merupakan penyebab infeksi nosokomial (Jawetz *et al* 2012).

4. *Staphylococcus aureus* yang resisten

S. aureus yang resisten adalah golongan bakteri Gram positif. *S. aureus* yang resisten dianggap sebagai salah satu organisme utama penyebab infeksi nosokomial sejak dilaporkan pada tahun 1961. Infeksi oleh *S. aureus* yang

resisten diasosiasikan dengan peningkatan morbiditas, kebutuhan akan terapi antibiotik yang lebih lama, dan peningkatan resiko kematian. Resiko ini meningkat lebih besar pada pasien yang telah diterapi kurang optimal, baik dengan terapi antibiotik yang tidak efektif maupun dengan intervensi bedah yang inadkuat (Lowy 2003).

G. Aktivitas Antibakteri

1. Antibakteri

Antibakteri adalah suatu zat atau senyawa yang dapat menekan atau membunuh pertumbuhan atau reproduksi bakteri. Senyawa atau zat yang digunakan untuk membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia, harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, artinya senyawa tersebut harus bersifat sangat toksik terhadap bakteri tetapi relatif tidak toksik untuk hospes.

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai zat bakteriostatik 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) (Ganiswarna 2007).

Obat pilihan pertama yang sering digunakan untuk *S. aureus* yang resisten adalah napsilin, sefazolin, klindamisin, vankomisin, dan linezolid, sedangkan pada terapi alternatif digunakan golongan sefalosporin generasi dua dan tiga (kecuali septazinin dan seftriakson), meropenem, imepenem, ertapenem, linezolid, dalpopristin, dan minosiklin (Cunha and Burke 2002).

2. Mekanisme kerja antibakteri

Mekanisme kerja senyawa antibakteri dibagi menjadi 5 yaitu :

Pertama, mengganggu metabolisme mikroba. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri harus mensintesis sendiri asam folat dari *Para Amino Benzoic Acid* (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antimikroba bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat, sehingga

terbentuk analog asam folat non fungsional menyebabkan kebutuhan asam folat tidak terpenuhi dan bisa menyebabkan bakteri mati (Ganiswarna 2005). Contoh antibakteri yang bekerja menghambat metabolisme sel bakteri adalah sulfonamida dan trimetoprim (Bakung 2014).

Kedua, menghambat sintesis dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri terdiri atas polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat rusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubah setelah terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Ganiswarna 2005). Contoh antibakteri golongan ini antara lain yaitu penisilin, sefalosporin, vankomisin, dan basitrasin (Radji 2002).

Ketiga, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri. Membran sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Ganiswarna 2005), contohnya adalah polimiksin, nistatin, golongan makrolida dan poliena (misal amfoterisin B) (Radji 2002).

Keempat, menghambat sintesis protein sel bakteri, bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein sehingga dihasilkan protein yang abnormal dan non fungsional bagi sel mikroba. Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini yaitu aktinomisin, rifampisin, streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, klindamisin, dan gentamisin (Radji 2002).

Kelima, menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri. Antibakteri yang memiliki mekanisme kerja ini pada umumnya bersifat toksik kurang selektif, karena antibakteri ini bersifat sitotoksi yang masih dapat diterima sebagai antibakteri (Ganiswarna 2005). Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini antara lain asam nalidiksat dan golongan kuinolon (Radji 2002).

3. Mekanisme resistensi

Resistensi sel mikroba adalah suatu sifat tidak terganggunya sel mikroba oleh antimikroba. Ada empat tipe mekanisme resistensi suatu mikroorganisme terhadap antibiotik.

Pertama, *natural resistance* (resistensi alamiah). Resistensi jenis ini disebabkan oleh karakteristik struktural bakteri dan tidak terkait dengan penggunaan antibiotik. Hal ini berkembang sebagai akibat dari resistensi alami, atau mikroorganisme tidak termasuk dalam sasaran antibiotik, atau antibiotik tidak mencapai target karena karakteristiknya. Sebagai contohnya, pemberian vankomisin tidak dapat melewati membran sel bakteri sehingga bakteri Gram negatif resisten terhadap vankomisin.

Kedua, *acquired resistance* (resistensi yang diperoleh). Merupakan resistensi yang diperoleh sebagai akibat dari perubahan karakteristik genetik dari bakteri. Resistensi ini terjadi akibat tidak berpengaruhnya antibiotik yang sebelumnya masih responsif. Resistensi ini terutama terjadi karena struktur kromosomal atau ekstrakromosomal (plasmid, transposon, dll). Resistensi kromosomal timbul dari mutasi spontan kromosom bakteri. Mutasi tersebut dapat terjadi karena faktor kimia dan faktor fisika. Hal ini dapat menyebabkan perubahan struktur sel bakteri, sehingga dapat menyebabkan menurunnya permeabilitas obat atau mengubah target obat pada sel.

Resistensi ekstrakromosomal adalah resistensi yang tergantung pada elemen genetik ekstrakromosomal yang dapat ditransfer melalui berbagai cara seperti plasmid. Plasmid adalah ekstrakromosomal fragmen DNA yang dapat mereplikasi secara independen dari kromosom. Gen plasmid biasanya bertanggung jawab mengontrol pembentukan enzim yang mampu merusak antimikroba. Kelompok plasmid yang membawa gen resistensi disebut faktor R. Faktor R dipindahkan dari bakteri satu ke bakteri lain dengan tiga cara yaitu transformasi, transduksi, dan konjugasi.

Ketiga, resistensi silang. Resistensi silang adalah keadaan resistensi terhadap antimikroba tertentu yang juga memperlihatkan sifat resistensi terhadap antimikroba lain. Biasanya terjadi antara antimikroba yang memiliki struktur

kimia yang hampir sama (derivat tetrasiklin) atau antara antimikroba dengan struktur kimia yang berbeda dengan mekanisme aksi yang hampir sama.

Keempat, *multi-drugresistance* dan *panresistance*. Organisme *multi-drugresistance* biasanya adalah bakteri yang menjadi resisten terhadap antibiotik yang dipakai untuk mengobatinya. Ini berarti obat tertentu tidak lagi mampu membunuh atau menghambat bakteri. Resistensi *multi-drug* pada bakteri dapat terjadi dengan dua mekanisme. Pertama, bakteri mengakumulasi beberapa gen, masing-masing mengkode resistensi terhadap obat tunggal. Kedua, resistensi terjadi karena peningkatan ekspresi pengkodean gen. Jika strain bakteri mengalami resisten terhadap tiga atau lebih antibiotik ini dianggap sebagai *multi-drug resistant*. Jika strain hanya peka terhadap satu atau dua antibiotik saja maka dianggap sebagai ekstensif *drugresistant*. Jika strain mengalami resisten terhadap semua golongan antibiotik maka dianggap sebagai *pan resistance* (Cesar and Demiroz 2013).

S. aureus memiliki struktur yang disebut dengan *genomic island*. Struktur ini merupakan struktur kontinyu yang beragam dalam ukuran mulai dari 15 kb sampai 70 kb dan dapat menghasilkan berbagai gen virulensi dan resistensi. *S. aureus* seringkali mengandung DNA heterolog yang mengindikasikan akuisisi eksogen. Struktur ini membantu dalam integrasi kromosom bakteri. Salah satu *genomic island* yang berperan dalam membantu menumbuhkan resistensi *S. aureus* terhadap berbagai antibiotik adalah *resistance island Staphylococcal chromosom casatte mec* atau SCCmec. MecA mengkode *Penicillin Binding Protein* (PBP) tertentu, disebut dengan PBP2a yang memiliki afinitas rendah terhadap metisilin dan berbagai jenis antibiotik betalaktam lain. PBP2a menyebabkan resistensi intrinsik terhadap betalaktam (Lowy 2003).

4. Resistensi terhadap betalaktam

S. aureus berubah menjadi galur resisten karena mendapat sisipan suatu elemen DNA berukuran besar antara 20-100 kb yang disebut *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec). SCCmec selalu mengandung *mecA* yaitu gen yang menyandi PBP2a yang mendasari resistensi *S. aureus*. Resistensi *S.*

aureus terhadap semua antimikroba golongan betalaktam disebabkan perubahan pada *protein binding penicillin* (PBP) yang normal yaitu PBP2 menjadi PBP2a. PBP2a memiliki afinitas yang sangat rendah terhadap betalaktam sehingga sekalipun bakteri ini dibiakan pada medium mengandung konsentrasi tinggi betalaktam, *S. aureus* yang resisten tetap dapat hidup dan mensintesa dinding sel (tumbuh). Eksplorasi pada struktur PBP2a menunjukkan adanya perubahan pada situs pengikatan (*binding site*) yang mengakibatkan rendahnya afinitas. PBP2a disandi oleh gen *mecA* yang merupakan bagian *SCCmec* (Memmi *et al* 2008).

Protein binding penicillin adalah sekelompok protein yang terlibat dalam biosintesa peptidoglikan yaitu mengkatalisa reaksi transpeptidasi (pembentukan anyaman peptida). Peptidoglikan *Staphylococcus* memiliki ciri khas berukuran panjang, berupa struktur anyaman (*cross linkage*) dengan rantai samping pentaglisin yang fleksibel. Peptidoglikan ini menjadi target antimikroba betalaktam. Resistensi terjadi karena produksi enzim betalaktamase seperti pada galur *S. aureus producing betalactamases* dan perubahan pada struktur PBP seperti yang terjadi pada MRSA. PBP 1, 2 dan 3 memiliki aktifitas transpeptidase primer sedangkan PBP 4 memiliki aktifitas transpeptidase sekunder. Reaksi lain dalam pembentukan peptidoglikan adalah transglikosilasi yang tidak berhubungan dengan *penicillin binding activity* (tidak berhubungan dengan reseptor penisilin). PBP2 memiliki aktifitas unik yaitu selain sebagai enzim transpeptidase ternyata juga memiliki aktifitas transglikosilase. Afinitas PBP2a yang sangat rendah terhadap betalaktam mengakibatkan antimikroba ini tidak dapat mempengaruhi reaksi transpeptidasi. Selain itu karena aktifitas transglikosilasi PBP2a sama sekali tidak terpengaruh oleh betalaktam maka diduga resistensi MRSA juga ditentukan oleh keutuhan fungsi transglikosilasi dari PBP2a ini (Memmi *et al* 2008).

Ekspresi gen *mecA* dikendalikan oleh gen regulator *mecR1* dan *mecI*. Pada keadaan tidak terinduksi/tidak ada induser maka *mecI* akan menekan transkripsi *mecA* dan *mecR1-mecI* (*mec complex*), sebaliknya bila ada induser atau terinduksi maka akan terjadi transkripsi pada *mec complex*. Sejauh ini baru metisilin dan antimikroba betalaktam lainnya yang diketahui merupakan induser. Selain oleh induser, induksi *mecI* juga dapat terjadi karena autokatalitik oleh protease pada

membran sel dan mutasi pada kromosom yang belum diketahui secara persis. Autokatalitik pada regulator penisilinase *blaI* juga diperkirakan dapat mengaktifkan *mecA*, karena sekuen *blaI* dengan *mecI* memiliki homologi yang tinggi (Horne *et al* 2009).

Secara fenotipik resistensi *S. aureus* yang resisten bersifat heterogen artinya dalam satu biakan, nilai MIC sangat bervariasi tergantung tipe SCC*mec* yang dikandungnya. Ekspresi resistensi *S. aureus* yang resisten juga dipengaruhi konsentrasi paparan betalaktam. Pada kondisi terdapat betalaktam maka nilai MIC akan mendekati nilai sensitif. Syarat mutlak resistensi adalah adanya PBP2a meskipun dalam jumlah minimal, tetapi ternyata peningkatan produksi PBP2a tidak berkorelasi dengan homogenitas resistensi. Sepasang galur *S. aureus* yang resisten dengan *mecA* yang sama dan produksi PBP2a yang juga sama tinggi ternyata menghasilkan ekspresi resistensi yang berbeda. Faktor genetik lain seperti gen betalaktamase dan faktor eksternal seperti temperatur, osmolaritas, kandungan ion, tekanan oksigen dan cahaya juga mempengaruhi ekspresi resistensi (Horne *et al* 2009).

H. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri suatu zat digunakan untuk mengetahui apakah zat tersebut dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri uji. Aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan dua metode yaitu :

Pertama, metode difusi. Metode ini dapat dilakukan dengan menggunakan cakram (*disk*), kertas saring, sumuran atau silinder tak 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 digunakan diolesi bakteri uji. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat. Metode difusi agar dipengaruhi oleh faktor fisika kimia, faktor antara obat dan organisme (Jawetz *et al* 2001).

Kedua, metode dilusi. Metode ini dilakukan dengan mencampur secara homogen suatu obat dalam media dengan jumlah atau konsentrasi yang berbeda-

beda, masing-masing media ditambahkan suspensi kemudian diinkubasi dan diamati daerah media yang jernih (Bonang dan Koeswardono 1982). Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap pada media cair maupun padat. Media diinokulasikan terhadap bakteri uji, selanjutnya diinkubasi dan diamati konsentrasi antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji. Keuntungan metode ini adalah memberikan hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al* 2005).

I. Vankomisin

Vankomisin merupakan glikoprotein kecil (Mol Wt ~ 1,450) turunan dari *tricyclic glycosylated nonribosomal peptide* yang dihasilkan dari fermentasi *Antinobacteria* spesies *Amycolatopsis orientalis*. Vankomisin aktif terhadap sebagian besar kuman Gram positif termasuk spesies *Streptococci*, *Corynebacteria*, *Clostridia*, *Listeria*, dan *Bacillus* (Anaizi 2002).

Vankomisin membunuh bakteri dengan cara menghambat sintesis dinding sel bakteri. Penghambatan sintesis dinding sel bakteri ini dilakukan melalui proses inhibisi penggabungan subunit *N-acetylmuramic acid* (NAM) dengan *N-acetylglucosamine* (NAG) dalam membentuk matrix peptidoglikan. Peptidoglikan ini adalah komponen utama pembentuk struktur dinding sel bakteri gram positif. Hal ini juga mengakibatkan kerusakan membran sel bakteri dan mengganggu sintesis RNA bakteri (Anaizi 2002).

Indikasi utama vankomisin ialah septicemia dan endocarditis yang disebabkan oleh *Staphylococcus*, *Streptococcus*, atau *Enterococcus* bila pasien alergi terhadap penisilin atau sefalosforin. Vankomisin merupakan obat terpilih untuk infeksi oleh kuman MRSA dan *colitis* oleh *Clostridium difficile* akibat penggunaan antibiotik (Goodman 2010).

Obat ini sangat toksin sehingga hanya digunakan bila pasien alergi terhadap obat lain yang lebih aman. Ketulian permanen dan uremia yang fatal dapat terjadi pada pemberian dosis besar, terapi yang lama, atau bila diberikan pada pasien gangguan ginjal. Tromboflebitis dan nyeri lokal yang hebat dapat

terjadi pada pemberian IV yang lama. Efek samping lain yang mungkin terjadi antara lain shock anafilaksis, toksis epidermal nekrosis, eritema multiforme, trombositopeni, neutropenia, leukopenia, tinnitus, pening. Vankomisin juga dapat menstimulasi pembentukan *platelet-reactive antibodies* pada tubuh pasien sehingga terjadi trombositopenia, *petechie*, *hemorrhage*, *ecchymoses*, dan *wet purpura* (Goodman 2010).

J. Landasan Teori

Penyakit infeksi yang banyak diderita masyarakat adalah infeksi kulit yang disebabkan *S. aureus* (Oktalia 2009). *S. aureus* merupakan flora normal pada kulit atau daerah saluran pernafasan bagian atas dan penyebab infeksi piogenik (menghasilkan pus) pada manusia (Jawetz *et al* 2005). *S. aureus* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan infeksi dengan tanda-tanda khas seperti nekrosis dan pembentukan abses. Saat ini *S. aureus* telah berkembang menjadi *S. aureus* yang resisten terhadap antibakteri golongan penisilin dan beberapa golongan lain. Tingginya angka kejadian *S. aureus* yang resisten mendorong peneliti untuk mencari obat baru yang lebih efektif dan aman salah satunya dengan menggunakan bahan alam. Salah satu bahan alam yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri adalah daun belimbing wuluh. Pada penelitian sebelumnya belimbing wuluh terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

Senyawa yang diduga memiliki aktivitas antibakteri yaitu flavonoid yang dapat mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki kembali atau *irreversible* (Prayudhani *et al* 2012). Saponin memiliki kemampuan dalam merusak permeabilitas membran yang mengakibatkan dinding sel rusak atau hancur (Ayuningtyas 2008). Ajizah (2004) menyatakan bahwa tanin dapat berikatan dengan dinding sel mikroorganisme dan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim.

Metode yang digunakan untuk memperoleh ekstrak daun belimbing wuluh dalam penelitian ini adalah maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, karena pada penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa etanol 70% memiliki aktivitas

yang lebih baik dibandingkan dengan pelarut air dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* (Pendit *et al* 2016).

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan tiga pelarut dengan polaritas yang berbeda-beda, pelarut yang digunakan *n*-heksan, etil asetat, dan air. Pelarut *n*-heksan sebagai pelarut non polar seperti terpenoid, minyak atsiri, steroid, dan karotenoid. Pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar dapat menyari senyawa yang bersifat semi polar seperti flavonoid dan alkaloid, dan air sebagai pelarut polar dapat menyari senyawa seperti saponin, tanin, gula, glikosida, dan garam alkaloid. Golongan senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antibakteri akan larut dalam pelarut semi polar yaitu etil asetat, sehingga dapat diperkirakan bahwa dari ketiga fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air yang paling efektif adalah fraksi etil asetat (Depkes 2008). Hasil dari fraksinasi dan ekstrak etanol daun belimbing wuluh kemudian dilakukan uji antibakteri. Aktivitas antibakteri dari ekstrak daun belimbing wuluh diketahui dengan menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dilakukan untuk mengetahui nilai zona hambat dari ekstrak. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 1% dan sebagai kontrol positif adalah antibiotik vankomisin. Sedangkan metode dilusi dilakukan dengan cara membuat suatu seri konsentrasi yang terdiri dari beberapa tabung reaksi, masing-masing tabung ditambahkan bahan uji yang akan diperiksa kecuali tabung untuk kontrol positif, kemudian ditambahkan bakteri yang telah diencerkan 1:1000 ke dalam tiap-tiap tabung reaksi kecuali untuk kontrol negatif, hasil yang didapat di metode ini adalah nilai KHM dan KBM (Bonang dan Koeswardono 1982).

Pada penelitian sebelumnya uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh terhadap bakteri MRSA menunjukkan zona hambat sebesar 9,3 mm dan 11 mm pada konsentrasi ekstrak sebesar 40% dan 60%. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) tidak dapat dilihat karena pengaruh warna ekstrak yang pekat atau coklat. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) sebagai antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) adalah pada konsentrasi 15% (Wijayanti 2017).

K. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada, maka hipotesis dalam penelitian ini adalah :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun belimbing wuluh mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* yang resisten.

Kedua, diantara ketiga fraksi (*n*-heksan, etil asetat dan air) dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh yang mempunyai fraksi teraktif dalam menghambat bakteri *S. aureus* yang resisten ditentukan dari hasil penelitian.

Ketiga, nilai KHM dan KBM dari fraksi *n*-heksan etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap *S. aureus* yang resisten ditentukan dari hasil penelitian.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun belimbing wuluh yang diambil dari daerah Sukoharjo, Kabupaten Sukoharjo Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah suatu bagian dari populasi yang ada atau bagian yang diambil dengan kriteria tertentu, sehingga memenuhi syarat random dan representatif. Sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah daun belimbing wuluh yang diambil secara acak berwarna hijau, segar, dan tidak rusak. Tanaman ini diperoleh dari daerah Sukoharjo Jawa Tengah, yang diambil pada bulan September 2017.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dari penelitian ini adalah ekstrak daun belimbing wuluh hasil maserasi dengan pelarut etanol 70%, dan fraksi daun belimbing wuluh 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 belimbing wuluh terhadap kultur bakteri *S. aureus* yang resisten.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas untuk penelitian ini adalah dosis ekstrak daun belimbing wuluh.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi, fraksinasi, penyimpanan isolat bakteri, laboratorium, peneliti, sterilitas, media, peralatan, kemurnian bakteri serta pekerjaan aseptis sehingga tidak terjadi kontaminan.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan pilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat dari ekstrak daun belimbing wuluh dengan dosis yang berbeda-beda, dan diameter daya hambat fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak daun belimbing wuluh, terhadap bakteri *S. aureus* yang resisten.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun belimbing wuluh adalah seluruh daun pada tanaman belimbing wuluh berwarna hijau yang diperoleh dari daerah Sukoharjo, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk adalah simplisia kering daun belimbing wuluh yang dihaluskan dengan penggiling dan diayak dengan pengayak ukuran mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun belimbing wuluh adalah cairan hasil penarikan sari dari daun belimbing wuluh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian diuapkan dengan evaporator sampai bebas etanol, setelah itu oven untuk mendapat ekstrak kental, dan dilanjutkan dengan 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 belimbing wuluh dengan fraksinasi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksan sebagai pelarut non polar, kemudian dipekatkan dengan evaporator 40°C 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 evaporator 40°C sehingga didapat fraksi etil asetat.

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

Ketujuh, bakteri uji yang digunakan adalah *S. aureus* ATCC 25923 yang diambil dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, isolat *S. aureus* yang resisten adalah *S. aureus* yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta yang resisten terhadap oksasilin 5 µg dan sefoksitin 10 µg.

Kesembilan, cakram antibiotik vankomisin adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia vankomisin dengan dosis 30 µg yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kesepuluh, cakram steril yang belum mengandung agensia kimia adalah yang nantinya akan ditetesi dengan ekstrak belimbing wuluh, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air.

Kesebelas, uji sensitivitas adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kepekaan bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan bakteri *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik oksasilin dan sefoksitin menggunakan metode difusi dengan media MHA, dengan cara mengukur diameter hambat kemudian dibandingkan dengan tabel *Interpretive Standards Kirby Bauer*.

Keduabelas, metode dilusi adalah metode uji aktivitas antibakteri dengan membuat satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu 60%; 30%; 15%; 7,5%; 3,75%; 1,88%; 0,94%; 0,47%. Kontrol positif berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan bakteri uji, kontrol negatif berisi media BHI dan fraksi teraktif.

Ketigabelas, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari suatu antimikroba yang akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme.

Keempatbelas, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terkecil yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri setelah diinokulasi pada media.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat untuk membuat simplisia yaitu pisau untuk merajang, mesin penggiling dan ayakan nomor 40. Alat penyari yang digunakan adalah seperangkat alat maserasi, *vacuum rotary evaporator*, *moisture balance*, bejana maserasi, water bath, kain flanel, neraca elektrik, pipet, tabung reaksi, beker gelas.

Alat yang digunakan kultur bakteri adalah cawan petri steril, jarum Ose, rak tabung reaksi, inkas, lampu spirtus, korek api, tabung reaksi, kapas lidi steril, botol penampung steril, vorteks, objek gelas, mikroskop binokuler, pipet volum, penggaris, beker glass, labu takar, gelas ukur, kain lap, penjepit tabung reaksi, batang pengaduk, Ose platina, corong pisah, corong kaca, inkubator anaerob menggunakan jar, autoklaf, oven, rak tabung, lempeng silika gel, GF 254, mikroskop, alat penyemprot, mikropipet (sokoreks model SL-1000) dan LAF (*Laminar Air Flow*).

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun belimbing wuluh, bakteri *S. aureus* ATCC 25923, bakteri *S. aureus* yang resisten. Medium yang digunakan adalah *Muller Hinton Agar* (MHA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Vogel Johnson Agar* (VJA).

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%, *n*-heksan, etil asetat, dan air sebagai larutan penyari, sitrat, aquadestilata, DMSO 1%, *Mc. Farland* 0,5, kalium telurit, cat kristal violet, larutan lugol iodin, aseton, safranin, cakram antibiotik vankomisin, cakram antibiotik oksasilin, cakram antibiotik sefoksitin, cakram steril, sabun cair, spiritus, alkohol 70%, amil alkohol, HCl, CH₃COOH, H₂SO₄.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi daun belimbing wuluh

Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel tanaman berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis, makroskopis, dan ciri-ciri

morfologi yang ada pada tanaman terhadap pustaka yang dilakukan di laboratorium biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sebelas Maret Surakarta, Jawa Tengah.

2. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel daun belimbing wuluh dilakukan pada daun yang berwarna hijau, yang diambil di daerah Sukoharjo, Jawa Tengah. Daun kemudian dicuci dengan air untuk membersihkan kotoran yang menempel, lalu ditiriskan dan kemudian dikeringkan dengan oven.

3. Pembuatan serbuk daun belimbing wuluh

Daun yang telah dipilih kemudian dicuci dengan air untuk membersihkan kotoran yang menempel, lalu ditiriskan dan kemudian dikering anginkan dengan hingga kering yang bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama. Simplisia yang telah didapat kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40, setelah itu dilakukan perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah.

4. Susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh

Susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh dilakukan dengan cara serbuk daun belimbing wuluh ditimbang sebanyak 2 g, kemudian diukur kadar lembab dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Suhu yang digunakan adalah 105°C dan waktu pengeringan secara auto. Penandaan hasil analisa setelah selesai yaitu sampai diperoleh bobot konstan yang dilakukan penimbangan sebanyak tiga kali. Susut pengeringan memenuhi syarat dimana suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%.

5. Pembuatan ekstrak etanol

Ekstraksi serbuk daun belimbing wuluh dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk daun belimbing wuluh ditimbang 1000 g kemudian dimasukkan ke dalam bejana ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 10:75. Campuran tersebut didiamkan selama 5 hari dengan sesekali digojoy. Filtrat dengan ampas dipisahkan dengan menggunakan kain flanel. Filtrat yang didapat kemudian

dipekatkan dengan *Vacum Rotary Evaporator* dengan suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental daun belimbing wuluh.

6. Tes bebas etanol daun belimbing wuluh

Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat pekat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol ditandai dengan tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 2006).

7. Fraksinasi

Fraksinasi dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh dilakukan dengan cara menimbang 10 g ekstrak kental daun belimbing wuluh ditambahkan dengan pelarut air dan *n*-heksan dengan perbandingan 1:1 di dalam corong pisah, kemudian dikocok dan didiamkan hingga tepat memisah menjadi dua fase yaitu fraksi air dan fraksi *n*-heksan, fraksi *n*-heksan terletak di atas dan fraksi air di bawah. Fraksi *n*-heksan yang didapat dipekatkan menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 40°C dan fase air difraksinasi kembali menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1, masing-masing fraksinasi dilakukan tiga kali, dan dipisahkan sebanyak 3 kali dengan masing-masing 75 mL. Hasil yang didapat adalah fraksi etil asetat dan fraksi air kemudian diuapkan sampai pekat lalu ditimbang.

8. Identifikasi kandungan senyawa kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung didalam daun. Identifikasi senyawa meliputi senyawa flavonoid, saponin, dan tanin.

8.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 2 mg serbuk, ekstrak, dan fraksi daun belimbing wuluh ditambahkan 5 mL aquadest selama satu menit, disaring dan diambil filtratnya. Filtrat ditambah 0,1 g serbuk Mg, 2 mL larutan alkohol 70% : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran ini dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah, kuning, jingga, pada amil alkohol (Robinson 1995).

8.2 Identifikasi saponin. Sebanyak 10 mL air panas dalam tabung reaksi didinginkan kemudian ditambahkan sebanyak 0,5 g serbuk simplisia, ekstrak

dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Depkes 1989).

8.3 Identifikasi tanin. Serbuk simplisia, ekstrak ditambah 10 mL air panas kemudian dididihkan selama 15 menit dan saring. Filtrat yang diperoleh disebut larutan B. Sebanyak 5 mL larutan B ditambah pereaksi besi (III) klorida 1%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehitaman (Robinson 1995).

9. Sterilisasi

Sterilisasi inkas dengan menggunakan formalin, media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan oven pada suhu 170-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum Ose disterilkan dengan pemanasan api langsung.

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji diambil dari biakan murni pada media NA, diambil kurang lebih 2 Ose dan dimasukkan pada media BHI, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, kemudian diencerkan dengan aquadest steril sampai didapatkan kekeruhan yang disamakan dengan *Mc. Farland* 0,5 dengan jumlah koloni $1,5 \times 10^7$ - $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Suspensi diencerkan sebanyak 1:1000 untuk pengujian dilusi.

11. Identifikasi bakteri uji *S. aureus* yang resisten

11.1 Identifikasi morfologi koloni dengan media VJA. Suspensi bakteri diinokulasi pada media VJA yang sudah ditambahkan kalium tellurit 1% sebanyak 3 tetes dalam cawan petri dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni hitam dan warna medium sekitar koloni kuning. Hal ini disebabkan karena *S. aureus* dapat memfermentasi manitol menjadi asam dan adanya indikator fenol red menyebabkan warna medium di sekitar koloni kuning, sedangkan warna hitam pada koloni disebabkan *S. aureus* kalium tellurit menjadi metalik telurit.

11.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram *S. aureus* menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordant), Gram C (etanol : aseton = 1 : 1 sebagai peluntur), Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup). Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara dibuat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan Gram A sampai semua ulasan terwarnai, didiamkan selama kurang lebih 1 menit. Dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian ditetesi Gram B, didiamkan kurang lebih 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C dan didiamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian ditetesi Gram D dan didiamkan selama kurang lebih 1 menit. Dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian dikeringkan preparat. Bakteri *S. aureus* dinyatakan positif bila berwarna ungu, berbentuk bulat, dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati di bawah mikroskop. Sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah. Perbedaan warna ditentukan dari susunan dinding sel bakteri, jika bakteri memiliki peptidoglikan yang tebal akan berwarna ungu.

11.3 Identifikasi biokimia. Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada medium nutrisi cair ditambah dengan 2 tetes hidrogen peroksida 3%. Penambahan H_2O_2 akan terurai menjadi H_2O dan O_2 hasil dinyatakan positif bila terlihat gelembung udara disekitar koloni, hal ini disebabkan karena *S. aureus* mempunyai enzim katalase (Jawetz *et al* 2007).

Uji koagulase menggunakan plasma darah kelinci 200 μ L ditambah 1 Ose biakan bakteri dan sitrat, diinkubasi pada suhu 37°C. Tabung diperiksa dengan melihat pembentukan selama 1-4 jam. Hasilnya positif kuat jika tabung tes dibalik, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat padadinding tabung (Lay 1994).

11.4 Uji hemolisis. Uji hemolisis menggunakan suspensi bakteri *S. aureus* ditanam pada media agar darah, dan selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Adanya aktivitas hemolisis ditandai dengan adanya zona hemolisis pada media agar darah. *S. aureus* yang menghasilkan α -hemolisis akan

membentuk zona terang di sekitar koloni, yang menghasilkan β -hemolisis akan membentuk zona agak gelap di sekitar koloni, dan yang menghasilkan δ -hemoisis tidak terbentuk zona hemolisis di sekitar koloni. Sementara itu kuman yang memproduksi kombinasi alfa dan beta-hemolisis akan tampak zona gelap dan terang di sekitar koloni.

11.5 Uji sensitivitas *S. aureus* ATCC 25923 dan *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin dan vankomisin. Identifikasi bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *S. aureus* yang resisten dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar *Kirby Bauer*. Prinsip dari metode ini adalah penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme, yaitu zona hambat akan terlihat sebagai daerah jernih di sekitar cakram kertas yang mengandung zat antibakteri. Metode difusi dilakukan dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi yang telah dibuat dan ditekan-tekan pada ujung tabung, diratakan pada media MHA sampai rata. Pada media MHA yang telah ditumbuhi bakteri *S. aureus* ATCC 25923/*S. aureus* yang resisten kemudian diletakkan cakram antibiotik oksasilin, sefoksitin dan vankomisin kemudian media didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang agar agen antimikroba dapat berdifusi pada media agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil dapat dilihat dengan adanya area jernih yang menandakan adanya penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba. Zona hambat ditentukan dengan mengukur diameter area jernih kemudian dibandingkan dengan tabel *Interpretive Standart Kirby Bauer*.

12. Pengujian aktivitas antibakteri

Metode pengujian aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi pada penelitian ini menggunakan 3 cawan petri yang masing-masing berisi media MHA yang telah diberi suspensi bakteri yang sesuai dengan *Mc Farland* 0,5. Suspensi bakteri diratakan pada media MHA kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 5-10 menit agar bakteri terdifusi ke media. Media tersebut masing-masing dibagi menjadi 5 bagian yang sama, pada cawan petri pertama berisi cakram antibiotik vankomisin 30 μ g sebagai kontrol positif, cakram antibiotik oksasilin 5 μ g dan cakram sefoksitin 10 μ g sebagai kontrol pembanding, dan cakram steril yang berisi DMSO 1% sebagai kontrol

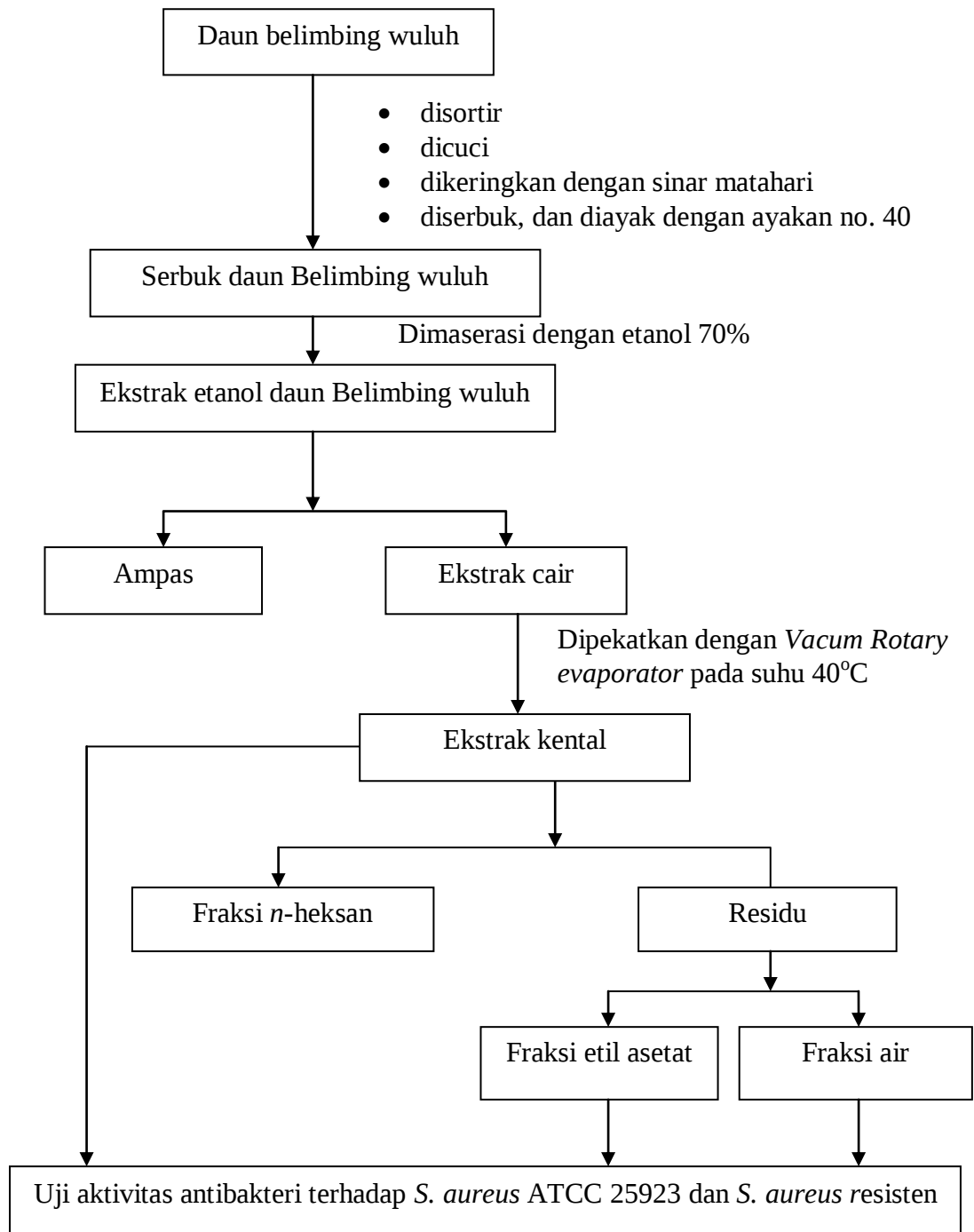
negatif. Cawan petri kedua berisi ekstrak etanol daun belimbing wuluh dari konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan 60%. Cawan petri ketiga berisi fraksi n-heksan dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan 60%. Cawan keempat berisi fraksi etil asetat dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan 60%. Dan cawan kelima berisi fraksi air dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50% dan 60%. Masing-masing konsentrasi tersebut dilakukan replikasi tiga kali untuk memperoleh data yang akurat. Area jernih di sekitar cakram diukur dan hasilnya adalah sebagai diameter zona hambat antibakteri. Pembuatan larutan stok fraksi teraktif menggunakan pelarut DMSO, hal ini disebabkan karena *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) merupakan salah satu pelarut yang dapat melarutkan senyawa semipolar. Selain itu, DMSO 1% apabila digunakan dalam penelitian ini tidak akan mempengaruhi hasil penelitian karena pelarut tersebut tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah bahan uji yang dapat membunuh bakteri uji. Metode ini menggunakan 1 deretan tabung reaksi yang terdiri dari 10 tabung reaksi steril. Tabung pertama sebagai kontrol negatif berisi ekstrak dan fraksi teraktif, dan tabung terakhir sebagai kontrol positif berisi suspensi bakteri. Tabung kedua sampai kesembilan adalah tabung seri pengenceran dengan konsentrasi masing-masing 60%; 30%; 15%; 7,5%; 3,75%; 1,88%; 0,94%; 0,47%. Media BHI dimasukkan ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptis sebanyak 1mL kecuali pada tabung pertama. Selanjutnya pada tabung nomer 2 hingga terakhir diberi suspensi bakteri yang sebelumnya sudah dicocokkan kekeruhannya dengan *Mc Farland* 0,5 sebanyak 0,2 mL. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. KBM ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif lalu diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 18-24 jam. Mengamati ada atau tidaknya koloni warna hitam dan di sekitar koloni berwarna kuning pada permukaan media VJA.

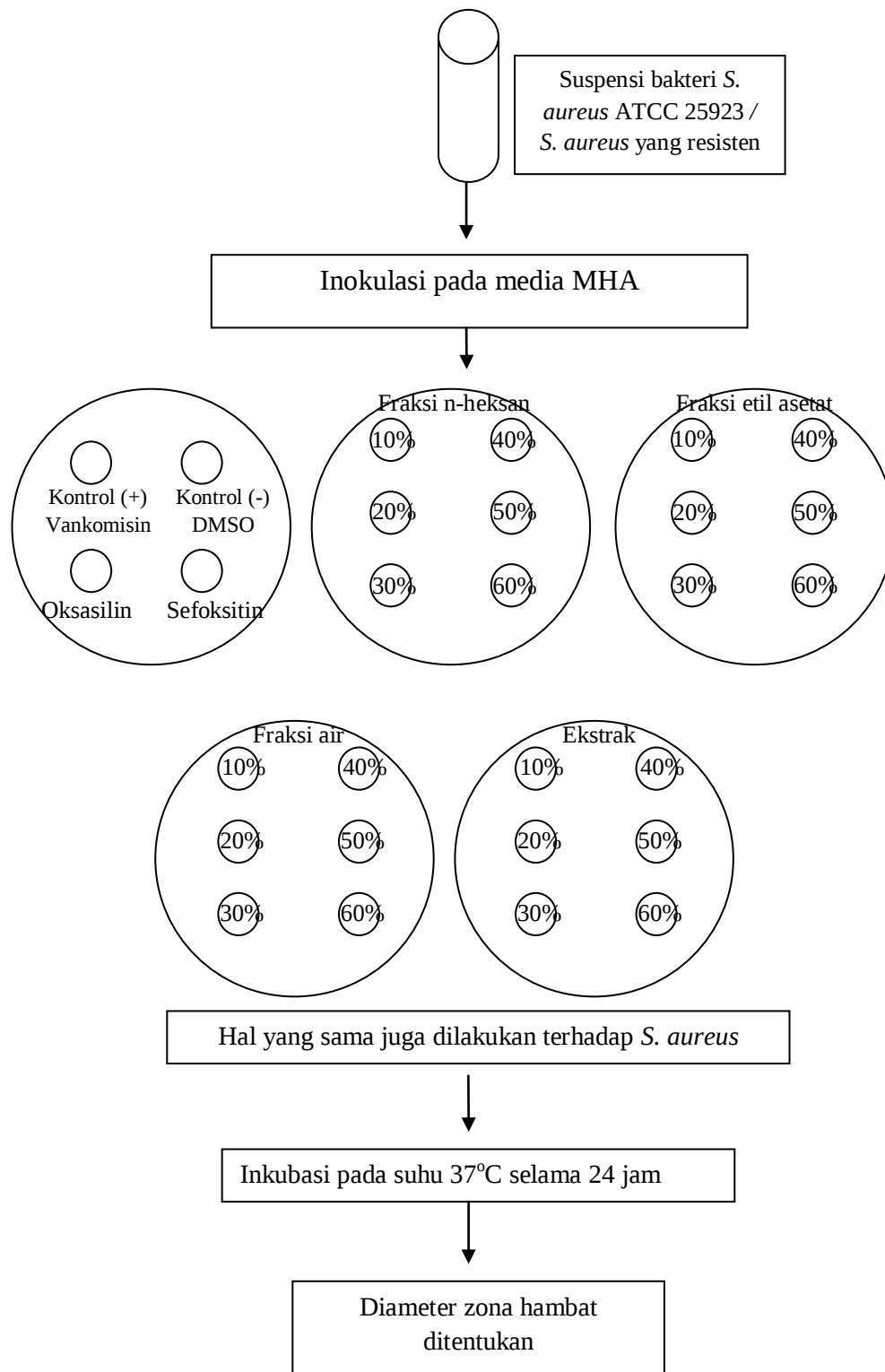
13. Analisis Data

Analisis hasil yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan mengamati kekeruhan pada tabung seri pengenceran, tabung jernih dengan urutan

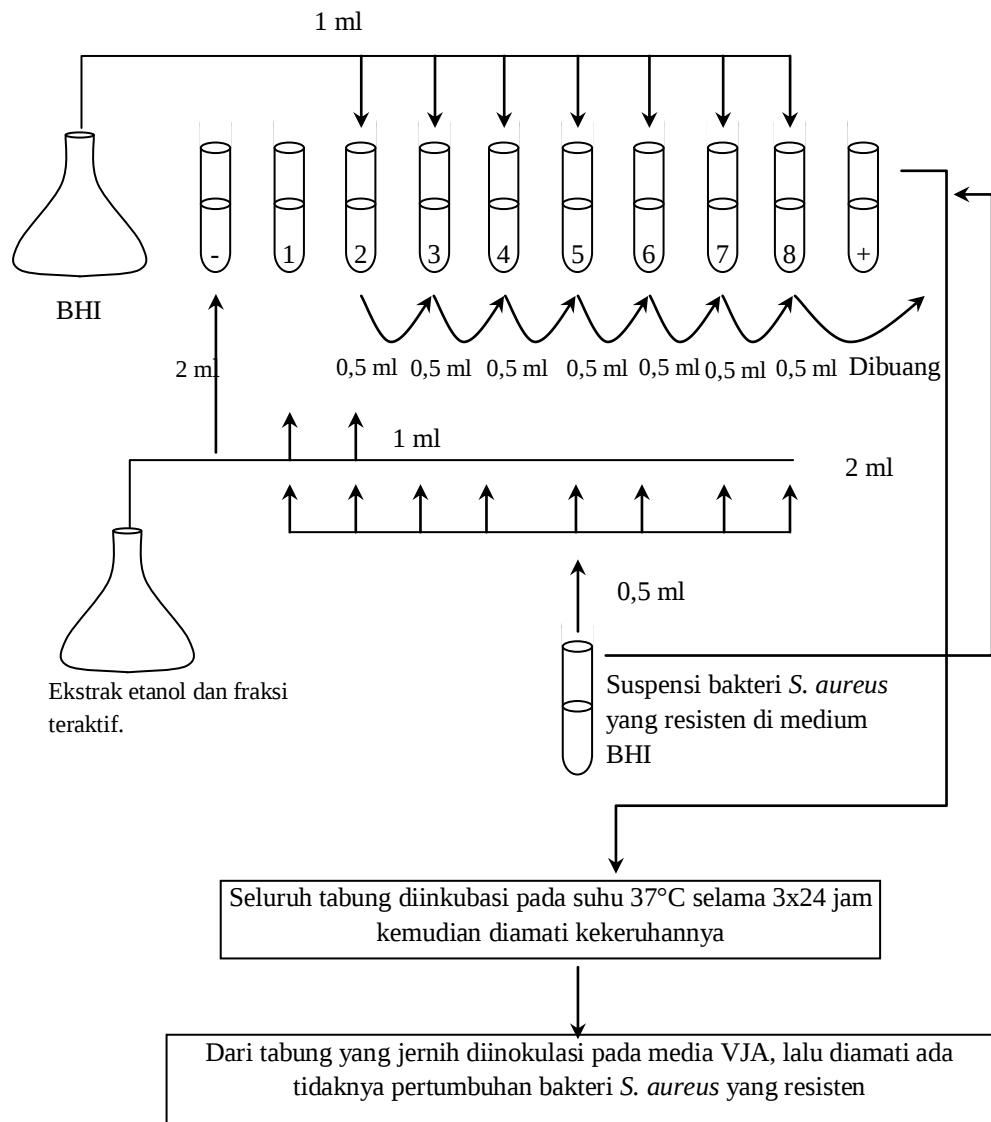
terakhir menunjukan nilai KHM. KBM ditentukan dengan menginokulasi seluruh tabung dalam cawan petri pada media VJA, kemudian dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri. Koloni bakteri berwarna hitam dan disekitar koloni berwarna kuning.



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun belimbing wuluh



Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi



Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh terhadap *S. aureus* yang resisten dengan metode dilusi

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Identifikasi Tanaman Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Identifikasi dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta. Identifikasi bertujuan untuk mencocokkan ciri - ciri morfologis simplisia, mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menghindari terjadinya kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan simplisia lain (Depkes RI 2000).

Berdasarkan hasil identifikasi yang telah dilakukan diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini benar tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pengumpulan bahan dan pengeringan

Daun belimbing wuluh diambil pada waktu sore hari pada saat cuaca cerah. Waktu pemanenan merupakan hal yang penting dalam menentukan kualitas dan kuantitas daun. Dipilih waktu pemanenan sore hari karena tumbuhan telah mengalami proses fotosintesis sempurna, sehingga metabolit yang dihasilkan lebih banyak. Daun dipilih dalam keadaan segar, berwarna hijau dan tidak rusak yang tumbuh di daerah Sukoharjo, Kecamatan Sukoharjo, Surakarta pada bulan September 2017. Daun yang telah dipetik disortir kemudian dicuci bersih untuk selanjutnya dilakukan pengeringan. Pengeringan dilakukan di bawah sinar matahari yang sebelumnya daun ditutupi oleh kain hitam agar tidak terpapar langsung oleh sinar matahari. Sinar ultraviolet pada matahari dapat merusak zat-zat yang terkandung di dalam daun. Pengeringan ini bertujuan agar kadar air dalam daun berkurang sehingga mencegah terjadinya pembusukkan oleh jamur atau mikroorganisme lainnya dan mencegah terjadinya perubahan kimia yang berakibat menurunkan mutu simplisia. Pengeringan dilakukan selama 5 hari hingga daun menjadi kering kemudian dilakukan perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh.

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Persentase (%)
6400	1000	15,62

Tabel 1 menunjukkan bahwa daun belimbing wuluh dengan bobot basah 6400 gram dikeringkan dan diperoleh bobot kering sebanyak 1000 gram. Persentase bobot kering terhadap bobot basah sebesar 15,62%. Perhitungan persentase bobot basah terhadap bobot kering dapat dilihat pada lampiran 12.

3. Pembuatan serbuk daun belimbing wuluh

Daun belimbing wuluh yang telah dikeringkan yang kemudian diserbuk menggunakan penggilingan, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40. Pengayakan ini bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel serbuk sehingga memperluas permukaannya dan mempermudah tertariknya zat aktif. Ayakan nomor 40 menunjukkan dimana dalam setiap inchi ayakan terdapat 40 lubang persegi dengan ukuran partikel sebesar 422 mikron. Serbuk hasil ayakan ini dinamakan serbuk simplisia yang digunakan untuk penyarian. Penyerbukan bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan, memperluas permukaan partikel dengan pelarut sehingga proses ekstraksi dapat berlangsung efektif (Parrot 1971).

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh

Penetapan susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh dilakukan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Sebanyak 2 gram serbuk ditimbang dan diukur susut keringnya menggunakan alat *moisture balance* pada suhu 105°C. *Moisture balance* merupakan alat yang digunakan untuk mengukur susut pengeringan, prinsip alat ini pada saat kumparan listrik memanaskan berat sampel secara otomatis dimonitor dan persentase kadar air dihitung, ketika persentase yang termonitor mencapai kestabilan maka alat akan memberikan tanda dan kadar air sampel ditampilkan. Kelebihan dari alat ini tidak memakan waktu lama, hasil yang ditampilkan tepat, mudah untuk dioperasikan, mengurangi *human error* pada saat penimbangan. Dalam penentuan susut pengeringan ini dilakukan tiga kali pengulangan untuk memperoleh nilai rata-rata susut pengeringan dari serbuk. Susut pengeringan tidak boleh lebih dari 10%, karena kadar lembab yang tinggi dalam simplisia dapat mengaktifkan enzim-enzim dalam

simplisia yang dapat berakibat rusak atau berubahnya komposisi kimia sehingga akan menurunkan kualitas simplisia tersebut (Voight 1994). Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh

No	Bobot awal (gram)	Susut pengeringan serbuk %
1	2	7,3
2	2	7,2
3	2	7,3
Rata-rata		7,26

Berdasarkan tabel 2 rata-rata susut pengeringan daun belimbing wuluh sebesar 7,26%. Perhitungan penetapan susut pengeringan daun belimbing wuluh dapat dilihat pada lampiran 12. Kadar air dalam serbuk simplisia dipersyaratkan kurang dari atau sama dengan 10%, karena dengan kadar tersebut sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif dan jamur tidak tumbuh (Depkes 1986). Penetapan kadar air dari simplisia perlu dilakukan mengingat air merupakan media tumbuhnya jamur, kapang, dan mikroorganisme lain yang dapat merusak simplisia. Reaksi enzimatik dengan adanya air dapat menurunkan mutu serbuk.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Metode pembuatan ekstrak pada penelitian ini dengan menggunakan cara maserasi karena pengerjaan dan peralatannya sederhana. Selain itu, cara maserasi lebih menguntungkan untuk senyawa yang tidak tahan panas, metode ini tidak menyebabkan terjadinya degradasi dari senyawa (Depkes 2000). Cairan penyari yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, kurkumin antrakinon, flavonoid, steroid, dan klorofil (Depkes 1986), etanol juga dapat menghambat kerja enzim sehingga terhindar dari proses hidrolisis dan oksidasi (Voight 1994).

Sebanyak 1000 gram serbuk dari daun belimbing wuluh yang dilarutkan dengan total pelarut sebanyak 10 L, diperoleh filtrat sebanyak 8,5 L. Bobot ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi adalah sebanyak 137,65 gram ekstrak. Data hasil pembuatan ekstrak etanol daun belimbing wuluh dan persen rendemen ekstrak dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Rendemen ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Bahan sampel	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen ekstrak (%)
1000	137,65	13,76

Berdasarkan tabel 3 persentase rendemen ekstrak maserasi daun belimbing wuluh yang diperoleh sebanyak 13,76%. Rendemen ditentukan untuk mengetahui persentase senyawa yang tertarik pada waktu proses ekstraksi. Berdasarkan hasil di atas menunjukkan ekstrak telah memenuhi standar sebagai ekstrak kental dengan presentase rendemen antara 5-30%. Ekstrak kental etanol yang didapat kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air dimaksudkan untuk memisahkan senyawa berdasarkan polaritasnya. Hasil perhitungandapat dilihat pada lampiran 12.

6. Tes bebas etanol ekstrak maserasi daun belimbing wuluh

Ekstrak daun belimbing wuluh dilakukan tes bebas etanol dengan melakukan ujiesterifikasi alkohol. Prinsip dari uji ini adalah suatu asam karboksilat yang direaksikan dengan senyawa alkohol dalam suasana asam, akan menghasilkan suatu ester dan H₂O yang terpisah. Hasil tes bebas etanol ekstrak daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 4.

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

Prosedur	Hasil	Pustaka
Ekstrak H ₂ SO _{4conc} +CH ₃ COOH, dipanaskan	+ Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol	Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk membebaskan ekstrak dari etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi, selain itu etanol sendiri bersifat sebagai antibakteri dan antifungi sehingga dapat menimbulkan positif palsu pada perlakuan sampel. Hasil tes bebas etanol pada tabel 4 menunjukkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh tersebut sudah bebas dari pelarutnya etanol 70% yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh

Ekstrak daun belimbing wuluh selanjutnya diidentifikasi kandungan senyawa kimia yang ada di dalamnya. Hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak etanol dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 5 dan gambar pada lampiran 5.

Tabel 5. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun belimbing wuluh secara kualitatif

Senyawa	Pustaka	Interpretasi hasil	
		Ekstrak	Fraksi teraktif
Saponin	Reaksi positif bila busa masih terbentuk selama 30 menit setelah penetesan HCl 2 N (Depkes 2005).	(+) busa tetap	(+) busa tetap
Tanin	Reaksi positif bila menjadi warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Robinson 1995).	(+) coklat kehijauan	(+) coklat kehijauan
Flavonoid	Reaksi positif bila timbul warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Robinson 1995).	(+) jingga pada lapisan amil alkohol	(+) jingga pada lapisan amil alkohol

Keterangan : + : ada senyawa

- : tidak ada senyawa

Pada tabel 5 terlihat ekstrak etanol daun belimbing wuluh menunjukkan hasil positif mengandung senyawa kimia flavonoid, saponin, dan tanin. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh (Pendit *et al* 2016) yang menunjukkan ekstrak etanol daun belimbing wuluh terbukti mengandung senyawa flavonoid, saponin, dan tanin. Hasil identifikasi kualitatif kandungan ekstrak etanol dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh dapat dilihat pada lampiran 5.

8. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Ekstrak daun belimbing wuluh yang diperoleh dari hasil maserasi, kemudian ditimbang sebanyak 10 gram untuk dilakukan fraksinasi. Fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Tujuan dilakukan fraksinasi adalah untuk memisahkan golongan senyawa dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan polaritasnya. Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi adalah *n*-heksan, etil asetat dan air. *n*-heksan merupakan pelarut yang bersifat non polar, etil asetat bersifat semi polar, dan air bersifat polar. Ekstrak ditimbang 10 gram kemudian dilarutkan dengan pelarut air dan *n*-heksan (1:1) di dalam corong pisah dan dilakukan

penggojogan selama 10 menit, sesekali corong pisah dibuka untuk mengeluarkan gas. Residu dari air kemudian dilanjutkan kembali menggunakan etil asetat dengan cara yang sama. Fraksinasi dilakukan replikasi sebanyak 3 kali dengan masing-masing 75 mL agar senyawa yang terkandung dalam ekstrak dapat benar-benar tertarik dalam pelarut. Hasil fraksi *n*-heksan dan etil asetat terletak diatas sedangkan fraksi air terletak dibawah, hal ini dikarenakan air memiliki berat jenis yang lebih besar dibandingkan *n*-heksan dan etil asetat. Hasil fraksinasi daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 6. Perhitungan rendemen fraksinasi dapat dilihat pada lampiran 12.

Tabel 6. Rendemen fraksinasi ekstrak etanolik daun belimbing wuluh

Nama Pelarut	Bobot ekstrak (gram)	Bobot Fraksi (gram)	Rendemen fraksi (%)
<i>N</i> - heksan	30	2,04	6,8
Etil asetat	30	3,58	11,93
Air	30	6,45	21,5

Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat bahwa perhitungan rendemen yang didapat pada setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun belimbing wuluh. Rendemen fraksi air lebih besar dibandingkan fraksi *n*-heksan dan fraksi etil asetat, sedangkan fraksi etil asetat lebih besar dari pada *n*-heksan. Air telah diketahui bersifat polar sehingga dapat diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam daun belimbing wuluh lebih banyak mengandung senyawa yang bersifat polar. Organoleptis fraksi *n*-heksan berwarna kehijauan, fraksi etil asetat berwarna hijau tua dan fraksi air berwarna cokelat.

9. Identifikasi bakteri uji *S. aureus* yang resisten

Identifikasi bakteri ini bertujuan untuk mencocokkan ciri-ciri morfologi bakteri sesuai dengan pustaka dan mengetahui kebenaran bakteri yang di uji adalah *S. aureus* yang resisten. Hasil pengujian yaitu beberapa koloni dengan warna hitam, karena *S. aureus* yang resisten dapat mereduksi telurit menjadi metalik, warna medium disekitar koloni berwarna kuning karena bakteri dapat memfermentasi mannitol menjadi asam yang kemudian mengubah indikator phenol red yang terdapat dalam media VJA dari warna merah menjadi warna kuning (Jawetz *et al* 2012).

Hasil pewarnaan Gram dengan perbesaran kuat (100x) tampak koloni berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur. Bakteri Gram positif (*S. aureus* yang resisten) memiliki dinding sel yang lebih tebal daripada bakteri Gram negatif, sehingga pada pengecatan Gram *S. aureus* yang resisten dapat mengikat kompleks zat warna kristal ungu-iodin dan dapat mempertahankan warna ungu dari Gram A (Pratita 2012).

Uji katalase penting untuk membedakan *Streptococcus* (katalase negatif) dengan *Staphylococcus* yang menghasilkan enzim katalase (katalase positif). Uji katalase dilakukan dengan menambahkan H_2O_2 3% ke isolat bakteri kultur yang menunjukkan katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara karena bakteri memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Uji katalase digunakan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri uji. Enzim ini penting untuk pertumbuhan aerobik karena H_2O_2 yang terbentuk oleh enzim pernafasan bersifat racun terhadap sel mikroba (Jawetz *et al* 2007). *S. aureus* yang resisten dapat bersifat patogen dan kurang patogen atau non patogen, cara membedakan sifat tersebut dapat melalui uji koagulase. Koagulase merupakan protein ekstraseluler yang dihasilkan oleh *S. aureus* yang dapat menggumpalkan plasma dengan bantuan faktor yang terdapat dalam serum. Oleh karena itu peran koagulase yang dihasilkan dapat digunakan sebagai sarana diagnostik (Bruckler *et al* 1994). Prinsip uji ini adalah terjadi atau tidak terjadinya penggumpalan plasma darah (plasma darah kelinci) setelah ditambahkan isolat biakan bakteri. Penggumpalan terjadi pada plasma darah yang ditambahkan isolat bakteri *Resistant S. aureus* sehingga uji koagulase positif untuk *S. aureus* yang resisten. Hasil positif ini menandakan bahwa bakteri *S. aureus* yang resisten adalah bakteri patogen.

Uji hemolisis pada *S. aureus* yang resisten dilakukan untuk mengetahui tipe hemolisis pada bakteri. Hemolisin merupakan toksin yang dapat membentuk suatu zona hemolisis di sekitar koloni bakteri. *S. aureus* menghasilkan 4 jenis toksin hemolitik yaitu α -hemolisis, β -hemolisis, γ -hemolisis dan δ -hemolisis (Bruckler *et al* 1994). α -hemolisis adalah toksin yang bertanggung jawab terhadap pembentukan zona hemolisis di sekitar koloni *S. aureus* pada media agar darah.

Toksin ini dapat menyebabkan nekrosis pada kulit hewan dan manusia. β -hemolisis merupakan toksin yang terutama dihasilkan *Staphylococcus* yang diisolasi dari hewan, yang menyebabkan lisis pada sel darah merah domba dan sapi. Sedangkan δ -hemolisis adalah toksin yang dapat melisiskan sel darah merah manusia dan kelinci, tetapi efek lisisnya kurang terhadap sel darah merah domba. Hasil menunjukkan daerah transparan yang terlihat di sekitar koloni menandakan bahwa *S. aureus* yang resisten tersebut merupakan tipe beta hemolisis. Beta hemolisis adalah hemolisis total (seluruh sel darah merah lisis) maka tampak zona yang jelas, mendekati warna dan transparansi media dasar, mengelilingi koloni. Produksi beta hemolisis merupakan toksin dari *Staphylococcus* yang berasal dari hewan, dapat menyebabkan terjadinya *hot-cold* lisis pada sel darah merah domba dan sapi (Merchant dan Parker 1961).

Tabel 7. Hasil identifikasi bakteri dengan uji katalase dan koagulase

Jenis uji	Hasil	Keterangan
Uji katalase	Terbentuk gelembung gas	(+)
Uji koagulase	Hasil reaksi terjadi penggumpalan	(+)
Uji hemolisis	Koloni kecil, transparan, berwarna putih	(+)

Keterangan: (+) : positif *Staphylococcus aureus*
 (-) : negatif *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan semua hasil uji dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri *S. aureus* yang resisten yang diidentifikasi adalah *Staphylococcus aureus*.

10. Uji sensitivitas *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik

S. aureus yang resisten merupakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah menjadi resisten terhadap antibiotik yang umumnya mampu membunuh *S. aureus* seperti antibiotik golongan beta-laktam seperti penisilin dan oksasilin. *S. aureus* yang resisten merupakan bakteri yang dapat menimbulkan berbagai infeksi, seperti infeksi pada kulit, tulang, paru-paru, jantung, atau infeksi sistemik, selain itu *S. aureus* yang resisten merupakan bakteri yang paling sering menjadi penyebab terjadinya infeksi nosokomial. Infeksi ini bisa menyebabkan pasien terkena bermacam-macam penyakit, dan setiap penyakit mempunyai gejala yang berbeda-beda. Beberapa penyakit yang paling sering terjadi akibat infeksi nosokomial adalah infeksi saluran kemih, infeksi aliran darah, pneumonia dan

infeksi luka operasi (Wirahjasa 2012). Hingga kini belum ada terapi infeksi *S. aureus* yang resisten yang benar-benar efektif, vankomisin yang merupakan *drug of choice* untuk infeksi *S. aureus* yang resisten ternyata memiliki efek bakterisidal yang lambat, tetapi sampai saat ini glikopeptida vankomisin masih merupakan pilihan terapi utama pada infeksi *S. aureus* yang resisten.

Glikopeptida vankomisin adalah molekul berukuran besar yang bekerja menghambat tahap akhir sintesa petidoglikan dan anyamannya. Secara umum diketahui bahwa glikopeptida mencegah reaksi transglikosilasi dan transpeptidasi sehingga terjadi kegagalan sintesa dinding sel. Vankomisin dikatakan peka terhadap *Staphylococcus* bila mampu mematikan pada konsentrasi 4 µg/mL, intermediet antara 8-16 µg/mL, dan resisten pada konsentrasi 32 µg/mL (Yuwono, 2012).

Uji sensitivitas pada bakteri *S. aureus* yang resisten dilakukan dengan membandingkan diameter zona hambat sesuai dengan tabel *Interpretive Standards Kirby Bauer*. Pada penelitian kali ini antibiotik yang digunakan untuk uji resistensi bakteri *S. aureus* yang resisten adalah oksasilin dan sefoksitin. Pada beberapa penelitian sebelumnya, seperti yang telah dilakukan oleh Sudigdoadi (2010) oksasilin dianggap lebih stabil, sensitif terhadap isolat heteroresisten. Sefoksitin merupakan salah satu antibiotik pilihan dalam uji sensitivitas bakteri *Resistant S. aureus*, hal ini dikarenakan secara struktur kimia medisinal antibiotik golongan penisilin dan golongan sefalosporin hampir sama, sehingga dianggap mampu membuktikan sensitivitas bakteri *S. aureus* yang resisten. Berdasarkan beberapa publikasi telah menunjukkan bahwa sefoksitin lebih dapat diandalkan daripada oksasilin.

Tabel 8. Hasil uji sensitivitas *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin, dan vankomisin.

Antibiotik	Diameter zona hambat (mm) <i>S. aureus</i> yang resisten
Oksasilin	0
Sefoksitin	0
Vankomisin	25

Dari hasil uji sensitivitas *S. aureus* yang resisten menunjukkan bahwa antibiotik oksasilin dan sefoksitin tidak memberikan zona hambat terhadap

bakteri. Berdasarkan tabel *Interpretive Standards Kirby Bauer* bakteri dinyatakan resisten terhadap oksasilin jika memiliki zona hambat ≤ 10 mm dan resisten terhadap sefoksitin jika memiliki zona hambat ≤ 21 mm. Berdasarkan hasil tersebut maka diketahui bakteri uji yang digunakan resisten terhadap antibiotik oksasilin dan sefoksitin, tetapi masih menunjukkan sensitivitas terhadap antibiotik vankomisin. Hal ini membuktikan bahwa bakteri yang digunakan benar *S. aureus* yang resisten.

11. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun belimbing wuluh

Pengujian aktivitas ekstrak belimbing wuluh terhadap *S. aureus* yang resisten dan *S. aureus* dilakukan dengan dua metode, yaitu secara difusi dan dilusi. Metode difusi bermanfaat untuk mengetahui zona hambat dari ekstrak yang bersifat bakteristatik, sementara pada metode dilusi dapat digunakan untuk mengetahui dosis minimal dari ekstrak yang bersifat bakteriosidal. Hasil uji dengan metode difusi dapat dilihat pada tabel 9 lampiran .

Tabel 9. Uji aktivitas antibakteri

Perlakuan	Rata-rata diameter zona hambat (mm) <i>S. aureus</i> yang resisten	SD	Rata-rata diameter zona hambat (mm) <i>S. aureus</i>	SD
Kontrol negatif	0	0	0	0
Kontrol positif	25	0,5	14	0,5
Kontrol 1	0	0	12	0,5
Kontrol 2	0	0	11	0,5
Ekstrak 10%	0	0	9	0,5
Ekstrak 20%	8	0,5	10	0
Ekstrak 30%	9	0	11	0,5
Ekstrak 40%	9,8	0,3	10,3	0,5
Ekstrak 50%	11	0,5	11,2	0,2
Ekstrak 60%	12	0,5	15	0,5
Fraksi n-heksan 10%	0	0	0	0
Fraksi n-heksan 20%	6	0,5	0	0
Fraksi n-heksan 30%	6	0,5	6,4	0,5
Fraksi n-heksan 40%	6	0,5	6	0,5
Fraksi n-heksan 50%	7,1	0,1	6	0,5
Fraksi n-heksan 60%	8	0,5	8	0,5
Fraksi etil asetat 10%	9	0,5	8,7	0,5
Fraksi etil asetat 20%	10	0,5	9	0,5
Fraksi etil asetat 30%	10	0,5	10	0,5
Fraksi etil asetat 40%	10,4	0,5	11	0
Fraksi etil asetat 50%	11	0,5	12	0,5
Fraksi etil asetat 60%	11	0	12	0,5
Fraksi air 10%	0	0	0	0
Fraksi air 20%	0	0	0	0
Fraksi air 30%	0	0	0	0

Fraksi air 40%	0	0	0	0
Fraksi air 50%	0	0	0	0
Fraksi air 60%	0	0	0	0

Keterangan :

Kontrol negatif : DMSO 1%

Kontrol positif : vankomisin

Kontrol pembanding 1 : oksasilin

Kontrol pembanding 2 : sefoksitin

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *S. aureus* yang resisten, dengan tujuan dapat mengetahui besarnya zona hambat yang diberikan oleh ekstrak etanol dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh. Berdasarkan data yang diperoleh, maka konsentrasi ekstrak dan fraksi yang dipilih untuk penelitian ini adalah ekstrak dan fraksi etil asetat dengan konsentrasi 60%. Hal ini dikarenakan zona hambat yang muncul pada ekstrak dan fraksi *n*-heksan, etil asetat, air dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% terlalu kecil dan mempunyai *range* yang terlalu dekat dengan zona hambat metisilin yang dianggap resisten, yaitu ≤ 9 mm. Ekstrak etanol dalam penelitian ini dibuat dalam sediaan suspensi. Sediaan dibuat dalam bentuk suspensi dengan tujuan agar penyebaran zat aktifnya terdispersi dengan sempurna dan homogen.

Kontrol negatif dalam uji difusi ini adalah *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), yang digunakan sebagai pembanding untuk mengetahui adanya pengaruh pembawa terhadap meningkatnya lebar zona hambat terhadap bakteri MRSA. Senyawa pembawa yang digunakan untuk membuat suspensi ekstrak dan suspensi fraksi adalah DMSO dengan konsentrasi 1%. Hal ini dikarenakan sifat senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun belimbing wuluh bersifat polar, dan berdasarkan prinsip dasar kelarutan dimana suatu zat hanya akan larut dalam pelarut yang sesuai maka dipilih pelarut yang sesuai yaitu DMSO. Yuliani (2012) telah membuktikan bahwa DMSO 1% tidak aktif sebagai antibakteri, sehingga tidak mengganggu pengamatan uji aktivitas antibakteri. Kontrol positif dalam uji difusi ini adalah vankomisin, yang digunakan sebagai pembanding untuk mengetahui perbedaan zona hambat yang diberikan oleh antibiotik vankomisin dan ekstrak/fraksi daun belimbing wuluh. Antibiotik oksasilin dan sefoksitin dalam uji difusi ini digunakan sebagai kontrol pembanding guna untuk mengetahui zona hambat antibiotik pada bakteri *S. aureus* yang resisten.

Hasil penelitian uji difusi menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 60% mampu memberikan zona hambat sebesar 12 mm terhadap bakteri *S. aureus* yang resisten dari tiga kali replikasi, namun zona hambat yang berbeda ditunjukkan oleh ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi yang sama terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923. Penelitian yang dilakukan terhadap ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 60% *S. aureus* ATCC 25923 menunjukkan diameter hambat yang terbentuk sebesar 15 mm dari tiga kali replikasi. Sedangkan fraksi etil asetat dengan konsentrasi 60% menunjukkan diameter sebesar 11 mm pada bakteri *S. aureus* yang resisten dan 12 mm pada *S. aureus* ATCC 25923. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh dan fraksi etil asetat mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* baik yang telah resisten maupun tidak. Hal yang berbeda ditunjukkan pada fraksi n-heksan yang mempunyai kemampuan sedikit dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *S. aureus* yang resisten ditunjukkan dengan terbentuknya diameter sebesar 8 mm pada masing masing bakteri dengan konsentrasi yang sama yaitu 60%. Pada fraksi air tidak menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri pada kedua bakteri yang digunakan, hal ini ditunjukkan pada terbentuknya diameter sebesar 5 mm pada konsentrasi yang sama yaitu 60%. Namun, perlakuan uji sebaiknya menggunakan satu cawan yang berisi kontrol negatif, kontrol positif, oksasilin, dan sefoksitin serta sampel dengan satu konsentrasi.

Beberapa senyawa yang terkandung dalam daun belimbing wuluh seperti flavonoid, saponin, dan tanin diketahui mempunyai kemampuan sebagai antibakteri. Senyawa saponin dapat bekerja sebagai bakteriostatik dengan cara merusak membran sitoplasma (Robinson 2005). Senyawa flavonoid berfungsi sebagai bakteriostatik dan mekanisme kerjanya mendenaturasi protein sel bakteri dan dapat merusak membran sitoplasma (Pelczar dkk. 1998). Sementara menurut Ajizah (2007) tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel sehingga mengganggu permeabilitas sel. Perbedaan diameter zona hambat pada bakteri *S. aureus* dan *S. aureus* yang resisten dikarenakan pada bakteri tersebut telah menjadi resisten, penyisipan gen *mecA* pada strain *S. aureus* menyebabkan

berubahnya PBP2 menjadi PBP2a yang memiliki afinitas rendah terhadap antibiotik golongan betalaktam. Hal ini menyebabkan permeabilitas membran sel pada bakteri *S. aureus* yang resisten tidak mudah untuk dirusak, sehingga ekstrak dianggap kurang mampu merusak sintesis dinding sel bakteri karena strain *S. aureus* yang resisten telah mengalami resistensi. Zona hambat yang terbentuk sebesar 12 mm pada ekstrak etanol dan 11 mm pada fraksi etil asetat dengan konsentrasi 60% membuktikan bahwa ekstrak etanol dan fraksi daun belimbing wuluh memiliki aktivitas antibakteri yang baik pada *S. aureus* yang resisten dibandingkan dengan antibiotik sebelumnya seperti metisilin, oksasilin, dan sefoksitin, meskipun aktivitas antibakterinya tidak bisa melebihi *drug of choice* pada terapi karena infeksi *S. aureus* yang resisten yaitu vankomisin. Aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi etil asetat ini berpotensi untuk menggantikan antibiotik sebelumnya yang telah resisten.

Hasil uji aktivitas ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri *S. aureus* yang resisten dengan metode dilusi. Konsentrasi ekstrak etanol dari daun belimbing wuluh adalah 60%; 30%; 15% 7,5%; 3,75%; 1,88%; 0,94%; 0,47% dengan kontrol positif berupa bakteri uji dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kontrol negatif berupa ekstrak etanol daun belimbing wuluh dan fraksi etil asetat daun belimbing wuluh. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) menunjukkan konsentrasi terendah ekstrak yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil uji dengan metode dilusi dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri *S. aureus* yang resisten dengan metode dilusi

No	Konsentrasi (%)	Hasil		
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	60	-	-	-
3	30	-	-	-
4	15	-	-	-
5	7,5	+	+	+
6	3,75	+	+	+
7	1,88	+	+	+
8	0,94	+	+	+
9	0,47	+	+	+
10	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :
 (-) : tidak ada pertumbuhan bakteri
 (+) : ada pertumbuhan bakteri
 Kontrol negatif : larutan stok (ekstrak)
 Kontrol positif : suspensi bakteri

Tabel 11. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun belimbing wuluh terhadap bakteri *S. aureus* yang resisten dengan metode dilusi

No	Konsentrasi (%)	Hasil		
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	60	-	-	-
3	30	-	-	-
4	15	+	+	+
5	7,5	+	+	+
6	3,75	+	+	+
7	1,88	+	+	+
8	0,94	+	+	+
9	0,47	+	+	+
10	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :
 (-) : tidak ada pertumbuhan bakteri
 (+) : ada pertumbuhan bakteri
 Kontrol negatif : larutan stok (fraksi etil asetat)
 Kontrol positif : suspensi bakteri

Hasil penelitian dengan metode dilusi ini seharusnya menunjukkan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol dan fraksi daun belimbing wuluh terhadap bakteri *S. aureus* yang resisten, tetapi pada penelitian kali ini KHM tidak dapat dilihat karena pengaruh warna ekstrak yang pekat (coklat), sehingga tidak dapat diketahui tabung jernih ditunjukkan pada konsentrasi berapa. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) diperoleh dari menginokulasi semua tabung pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil inkubasi menunjukkan pada konsentrasi 60%, 30% dan 15% untuk ekstrak etanol sedangkan untuk fraksi etil asetat pada konsentrasi 60% dan 30% tidak ada pertumbuhan koloni bakteri, sehingga diketahui nilai KBM ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri *S. aureus* yang resisten adalah pada konsentrasi 15% dan nilai KBM fraksi etil asetat terhadap bakteri *Resistant S. aureus* adalah pada konsentrasi 30%. Hal ini berkaitan dengan kandungan senyawa kimia dari ekstrak dan fraksi etil asetat daun belimbing wuluh yang berbeda dalam setiap seri pengenceran.

Kandungan belimbing wuluh yang diduga sebagai antibakteri adalah flavonoid, saponin, dan tanin. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dapat dibagi menjadi tiga yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat

fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme antibakteri flavonoid dalam menghambat sintesis asam nukleat adalah cincin A dan B yang memegang peran penting dalam proses interkalasi atau ikatan hydrogen dengan menumpuk basa pada asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA. Dihidroksilasi pada cincin A berperan penting pada aktivitas antibakteri flavonoid. Hal ini menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri dan lisosom. Kedua, mekanisme antibakteri flavonoid dengan cara menghambat fungsi membran sel yaitu dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler sehingga dapat merusak membran sel dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Penelitian lain membuktikan flavonoid mengganggu permeabilitas membran sel dan menghambat ikatan enzim ATPase dan fosfolipase. Ketiga, mekanisme antibakteri flavonoid dengan cara menghambat metabolisme energi yaitu dengan menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid menghambat sitokrom C reduktase sehingga proses metabolisme dan biosintesis makromolekuler terhambat (Cushnie 2005).

Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakterilisis, jadi mekanisme kerja saponin termasuk dalam kelompok antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida (Cavalieri *et al* 2005).

Tanin yang terdapat pada daun belimbing wuluh juga dapat berikatan dengan dinding sel mikroorganisme dan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim. Hal tersebut membuktikan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh memang mempunyai aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan kemampuannya dalam membunuh bakteri *S. aureus* yang resisten.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* yang resisten dengan konsentrasi 60% zona hambat yang dihasilkan sebesar 12 mm pada ekstrak etanol dan 11 mm pada fraksi etil asetat.

Kedua, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) tidak dapat dilihat karena pengaruh warna ekstrak yang pekat atau coklat. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) sebagai antibakteri terhadap *S. aureus* yang resisten adalah pada konsentrasi 15% sedangkan pada fraksi teraktif (etil asetat) adalah 30%.

B. Saran

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

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat ekstrak etanol belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap *S. aureus* yang resisten.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurahman D. 2008. *Biologi Kelompok Pertanian dan Kesehatan*. Bandung: Grafindo Media Pratama.
- Agoes G. 2007. *Teknologi Bahan Alam*. ITB Bandung.
- Anaizi N. 2002. *Vancomycin*. University of Rochester Medical Center 2:1-4
- Ansel HC. 2005. *Pengantar untuk Sediaan Farmasi*. Edisi keempat. Ibrahim F, penerjemah. Jakarta: UI Press. Terjemahan dari *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*. Hlm 40-43.
- Anwar C. 1994. *Pengantar Praktikum Kimia Organik*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Ayuningtyas AK. 2008. *Efektivitas Campuran Meniran (Phyllanthus niruri) dan Bawang Putih (Allium sativum) untuk Mengendalikan Infeksi Bakteri Aeromonas hydrophila pada Ikan Lele Dumbo (Clarias gariepinus)*. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Azmi N. 2013. *Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Serta Fraksi-fraksi Bunga Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus dan Klebsiella pneumonia*. Jurnal Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- Bakung CT. 2014. *Studi Penggunaan Antibiotik pada Pasien ISPA Rawat Jalan di Rumah Sakit Prof. Dr. Aloe Saboe Kota Gorontalo*. Gorontalo: Fakultas Farmasi, Universitas Negeri Gorontalo.
- Bonang G, Koeswardono. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: Gramedia.
- Bruckler J, Schwarz S, and Untermann, F. 1994. *Staphylokokken – infektionen und-enterotoxineband*. II/1, In: Blobel, H. und Schlie Ber (Eds.) Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- Cavalieri E, Chakravarti D, Guttenplan J. 2006. *Catechol estrogen quinines initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers od susceptibillity and cancer prevention*. Biochim. Biophys. Acta 1766(1): 63-78.
- Cushnie TPT, Lamb AJ. 2005. *Antimicrobial Activity of Flavonoids*. International Journal of Antimicrodial Agent 26:343-356.

- Darmadi. 2008. *Infeksi Nosokomial : Problematika dan Pengendaliannya 5*. Salemba Medika. Jakarta.
- Darmandi. 2008. *1001 Resep Herbal*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- [DEPKES RI]. 1979. *Materia Medika Indonesia*. Jilid 3. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI]. 1989. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI]. 2005. *Materia Medika Indonesia. Jilid III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI]. 2007. *Riset Kesehatan Dasar*. Edisi III. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Erikawati D, Santosaningsih D, Santoso S. 2016. *Tingginya prevalensi MRSA pada Isolat Klinik Periode 2010-2014 di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang, Indonesia*. Jurnal Kedokteran Brawijaya Vol. 29, No. 2.
- Fajiriah SA, Darmawan A, Sundowo N, Artanti. 2007. *Isolasi Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Etil Asetat Daun Benalu Dendrophthoe pentandra L. Miq yang Tumbuh pada Inang Lobi-lobi*. Jurnal Kimia Indonesia. 2: 17-20.
- Fardiza, Srikandi. 2001. *Mikrobiologi Pangan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Hlm 190.
- Farouq. 2003. *Ekstrak sebagai Salah Satu Pengembangan Bentuk Obat Tradisional. Seminar POKJANAS TOI XXIII*. Jakarta: Universitas Pancasila. Hlm 12.
- Ganiswarna. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi V. Jakarta: Gaya Baru. Hlm 585-598.
- Garrity, GM et al. 2007. *Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea*, Release 7.7. Michigan: Michigan State University Board of Trustees. Hlm 362-464.
- Goodman, Gilman. 2010. *Manual Farmakologi dan Terapi*. Brunton LL, Parker KL, editor. Sukandar EY, Adnyana IK, Sigit JI, Sasongko LDN, Anggadiredja K, alih bahasa; Manurung J, Aini N, Hadinata AH, Fazriyah Y, Vidhayanti H, editor edisi bahasa Indonesia. Jakarta: Penerbit buku Kedokteran EGC.

- Gritter RJ, Bobbit JM, Suhartini AE. 1991. *Pengantar Kromatografi Edisi Kedua*. Penerbit ITB. Bandung.
- Gunawan D, Mulyani S. 2004, *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi) Jilid I*. Jakarta: Penebar Swadaya. Hlm 77-82, 87-92.
- Hariana A. 2008. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Cetakan Kelima. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Horne KC et al. 2009. *Prospective Comparison of the Clinical Impacts of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Vancomycin-Susceptible MRSA*. American Society for Microbiology Vol.53.No. 8.
- Inyu. 2006. *Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi)*. [http://inyu.mutiply.com/journal/item/ 3.23Agustus2008](http://inyu.mutiply.com/journal/item/3.23Agustus2008).
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Surabaya: Salemba Medika. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2005. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan Edisi XXIV*. Bonang G, penerjemah. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2007. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan Edisi XXV*. Bonang G, penerjemah. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan Edisi XXVI*. Ed. Elferia Nr, Penerjemah. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Kusuma SA. 2009. *Staphylococcus aureus* [KTI]. Bogor: Fakultas Farmasi. Universitas Padjadjaran.
- Kurnia YN, Afifah A, Mustofa, Firdausy U. 2010. *Pengaruh Pemberian Air Rebusan Daun Pare (Momordica charantia L) terhadap Kadar Kolesterol Total Serum Darah Tikus Putih (Rattus norvegicus) dengan Induksi Hiperkolesterolemia [PKM]*. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Sebelas Maret.
- Lathifah QA. 2008. *Uji Efektifitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri pada Buah Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.) dengan Variasi Pelarut*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri.
- Lay BW. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.

- Lowy FD. 2003. *Antimicrobial Resistance: The Example of Staphylococcus aureus*. The Journal of Clinical Investigation Vol.111, No. 9.
- Memmi Get al. 2008. *Staphylococcus aureus PBP4 is Essential for BetalactamResistance in Community-Acquired Methicillin-Resistant Strains*. American Society for Microbiology Vol. 52, No. 11.
- Merchant LA., Parker RA. 1961. *Veterinary Bacteriology and Virology*. The Iowa State University Press: Ames. Iowa. Pp 306-308.
- Parrot EL. 1971. *Pharmaceutical Technology Fundamental Pharmaceutics*. 3th. Burgess Publishing Company. Minneapolis. 76-82.
- Pelczar JM. 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid 2*. Alih Bahasa: Ratna Siri Hadiotomo. Jakarta: UI Press.
- Pendit P, Zubaidah E, Sriherfyna FH. 2016. *Karakteristik Fisika-Kimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.)*. Jurnal Pangan dan Agroindustri Universitas Brawijaya Vol.4, No. 1.
- Prastowo EA. 2013. *Standarisasi Simplisia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Pratama R. 2010. *Potensi Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Daun Sansevieria cylindrica*. Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- Pratita ND. 2012. *Hubungan Dukungan Pasangan dan Health Locus of Control Dengan Kepatuhan Dalam Menjalani Proses Pengobatan Pada Penderita Diabetes Mellitus Tipe 2*. Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya. Vol. 1. No. 1.
- Prayudhani MF, Hastuti US, Suarsini E. 2012. *Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kulit Batang Sawo Kecil (Manilkara kauki L.) terhadap Bakteri Escherichia coli*. [Laporan Penelitian]. Surakarta: Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Sebelas Maret.
- Radji M. 2002. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hlm 189-192.
- Radji M. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. EGC. Jakarta.
- Rachmawati, I., Suranto, dan Setyaningsih R. 2005. *Uji Antibakteri Bakteri Asam Laktat asal Asinan Sawi terhadap Bakteri Patogen*. Bioteknologi 2(2): 43-48.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung : Institut Teknologi Bandung. Hlm 77.

- Ryan KJ *et al.* 1994. *Medical Microbiology an Introduction to Infections Disease* 3rd ed. Connecticut: Appleton and Lange.
- Sudarsono D, Gunawan S, Wahyuono, Donatus, Purnama. 2002. *Tumbuhan obat II: Hasil Penelitian, Sifat – Sifat, Penggunaan.Cet I.* Yogyakarta:Pusat Studi Obat Tradisional Yogyakarta.
- Sudigdoadi S. 2010. *Mekanisme Timbulnya Resistensi Antibiotik pada Infeksi Bakteri.* Pp.1-14.
- Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar.* Jakarta: Papas Sinar Sinanti. Hlm 47.
- Suryono, Bambang. 2007. *Bakteriologi Umum dan Bakteriologi Klinik.* Semarang: AKK Bhakti Widya. Hlm 212-214.
- Tian Xiao-Juan. 2009. *Studies of Intestinal Permeability of 36 Flavonoids Using CaCO-2 Cell Monolayer Model.* International Journal of Pharmaceutics. Vol. 367.
- Voight R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi.* Soendani N, penerjemah. Indonesia: Gadjah Mada University Press.
- Wijayakusuma H. 2005. *Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Darah Tinggi.* Jakarta: Penebar Swadaya.
- Wirahjasa IG. 2012. *Pengelolaan Infeksi Akibat Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus.* Majalah Kedokteran Terapi Intensif.
- Yuliani Sri. 2012. *Panduan Lengkap Minyak Atsiri.* Penebar Swadaya. Bogor
- Yuwono. 2012. *Staphylococcus aureus dan Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA).* Palembang: Departemen Mikrobiologi FK Unsri.
- Zakaria ZA, Zaiton H, Henie EFP, Mat Jais MA. 2007.*In vitro Antibacterial Activity of Averrhoa bilimbi L. Leaves and Fruits Extracts.* International Journal of Tropical Medicine Vol.2, No. 3.

L

A

M

P

I

R

A

N

Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman belimbing wuluh



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

Nomor : 212/UN27.9.6.4/Lab/2017
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -

Nama Pemesan : Kartika Nur Astana
NIM : 19133959A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

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

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

Deskripsi Tumbuhan :

Habitus : pohon, menahun, tumbuh tegak, tinggi 5-15 m. Akar : tunggang, bercabang, putih kotor atau putih kekuningan. Batang : bentuk bulat, berkayu, permukaan batang kasar berbenjol-benjol; percabangan sedikit, arahnya condong ke atas, cabang muda berambut halus seperti beludru, warnanya coklat muda. Daun : tersusun spiral, meninggalkan bekas daun berbentuk jantung atau ginjal pada batang atau cabang, daun majemuk menyirip ganjil dengan 21-45 pasang anak daun; anak daun bertangkai pendek, bentuk bulat telur sampai jorong atau memanjang, panjang 2-10 cm, lebar 1,5-3 cm, ujung runcing, pangkal membundar, tepi rata, permukaan atas hijau tua, permukaan bawah hijau muda dan berbulu halus. Bunga : bunga majemuk berupa malai menggantung, berkelompok, keluar dari batang atau percabangan yang besar, panjang perbungaan 5-20 cm, bunga kecil-kecil berbentuk bintang, kelopak bunga 5-7 mm, hijau; daun mahkota bunga bentuk lanset atau spatel, hampir bergandengan atau tidak, panjang 13-20 mm, ungu gelap sampai ungu kemerahan tapi lebih pucat pada bagian pangkalnya; benangsari 10, semuanya fertil, yang berhadapan dengan daun mahkota bunga akan menjadi staminodia (steril), panjang 3-4 cm; putik dengan tangkai putik yang sama panjangnya (*homostylus*). Buah : buah buni, bentuknya bulat lonjong bersegi, panjang 4-6.5 cm, beruang 5, tiap ruangan berisi 2-3 biji, warnanya hijau kekuningan, bila masak berair banyak, rasanya asam. Biji : bentuknya bulat telur, gepeng, panjang 6-7 mm.

Surakarta, 9 Oktober 2017

Kepala Lab. Program Studi Biologi

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

Penanggungjawab
Determinasi Tumbuhan

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



Mengetahui
Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS

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

Lampiran 2. Tanaman dan serbuk daun belimbing wuluh



Lampiran 3. Serangkaian proses maserasi



Daun belimbing wuluh basah



Daun belimbing wuluh kering



Mesin penggiling



Simplisia kering



Penyaringan ekstrak



Ekstrak



Pemekatan/evaporasi

Lampiran 4. Penetapan kadar air serbuk daun belimbing wuluh dan uji bebas etanol ekstrak belimbing wuluh



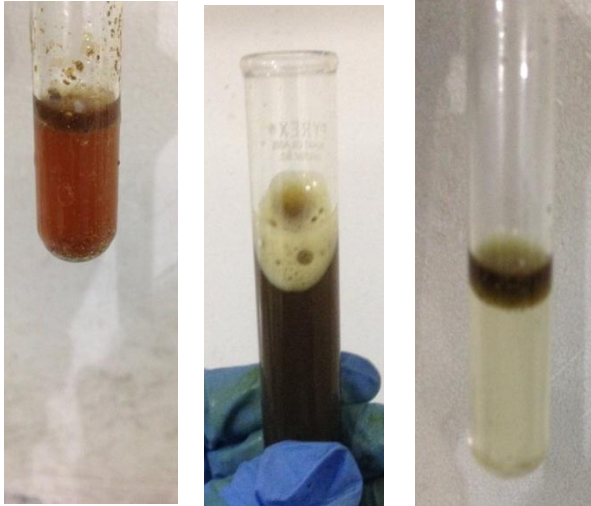
Penetapan kadar air serbuk daun belimbing wuluh



Uji bebas etanol ekstrak belimbing wuluh

Lampiran 5. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh

Ekstrak

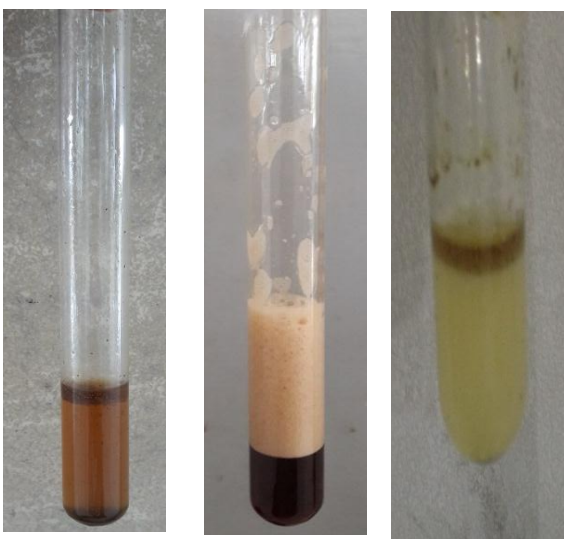


Flavonoid

Saponin

Tanin

Fraksi teraktif (fraksi etil asetat)

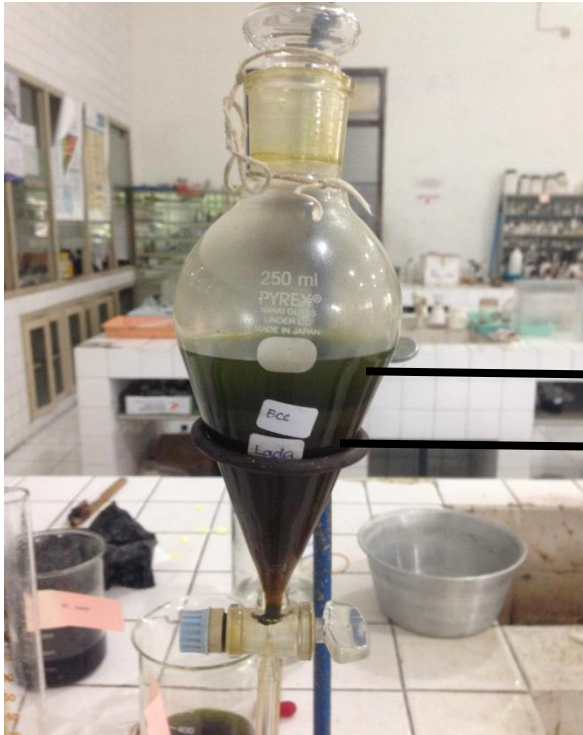


Flavonoid

Saponin

Tanin

Lampiran 6. Fraksinasi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air



N-heksan

Air



Etil asetat

Air

Lampiran 7. Ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air



Ekstrak



Fraksi *n*-heksan

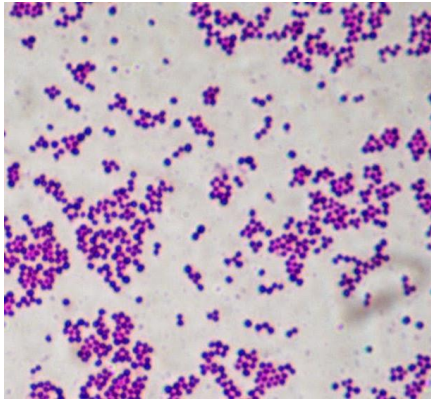


Fraksi etil asetat

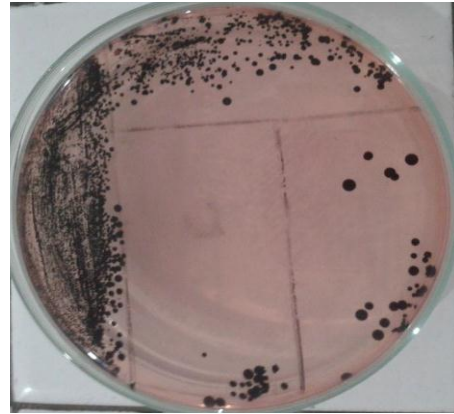


Fraksi air

Lampiran 8. Hasil identifikasi makroskopis, mikroskopis, uji biokimia dan uji hemolisis bakteri *S. aureus* yang resisten



Identifikasi mikroskopis



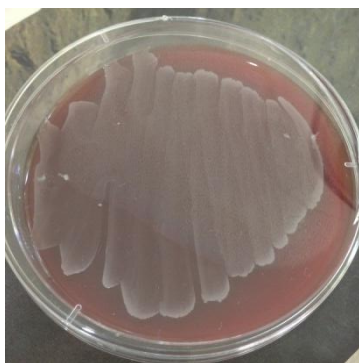
Identifikasi makroskopis



Uji katalase

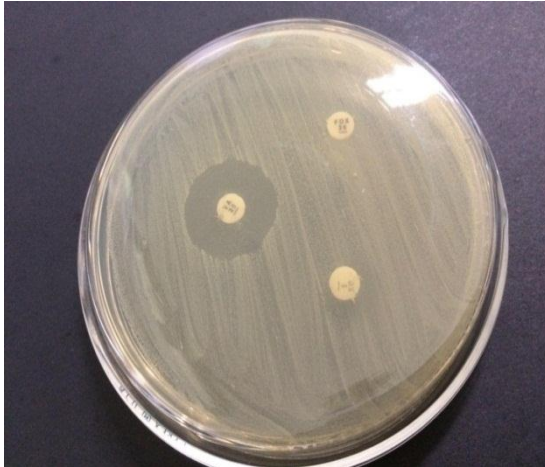


Uji koagulase



Uji hemolisis

Lampiran 9. Gambar uji sensitivitas *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin, vankomisin dan uji sensitivitas *S. aureus* terhadap antibiotik oksasilin dan sefoksitin

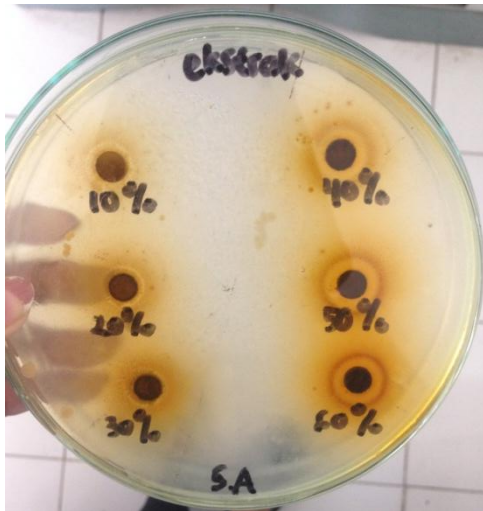


Uji sensitivitas *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik oksasilin dan sefoksitin

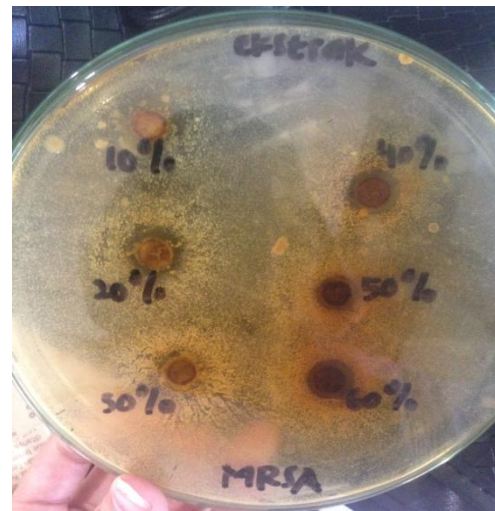


Uji sensitivitas *S. aureus* terhadap antibiotik oksasilin dan sefoksitin

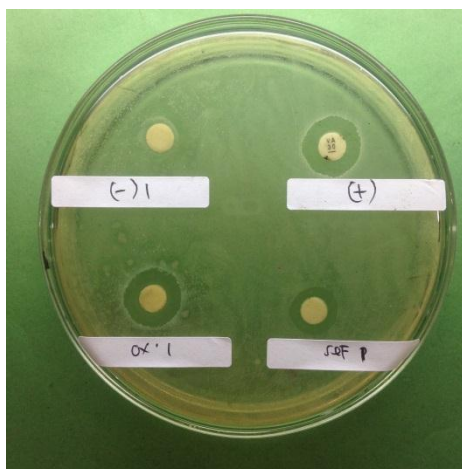
Lampiran 10. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap *S. aureus* yang resisten dan *S. aureus* secara difusi



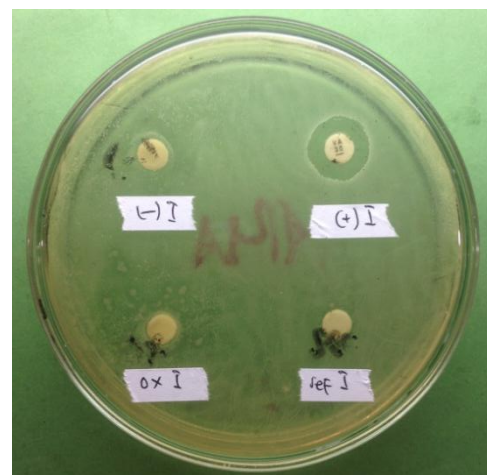
Ekstrak terhadap *S. aureus*



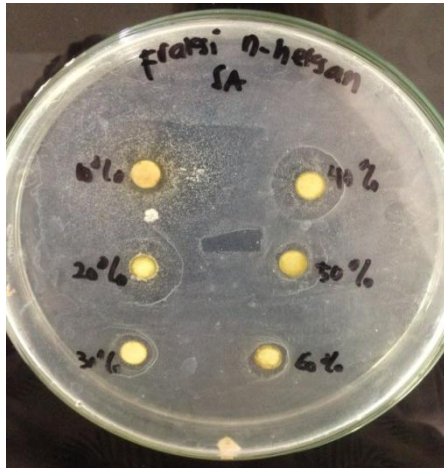
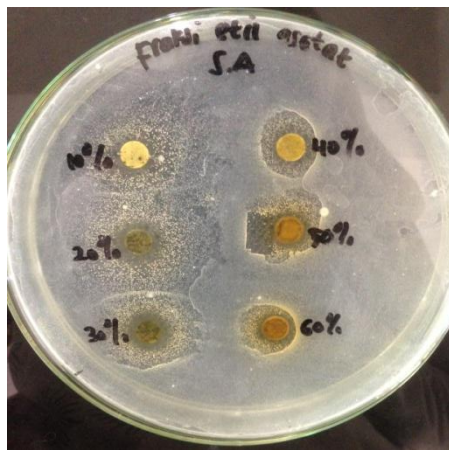
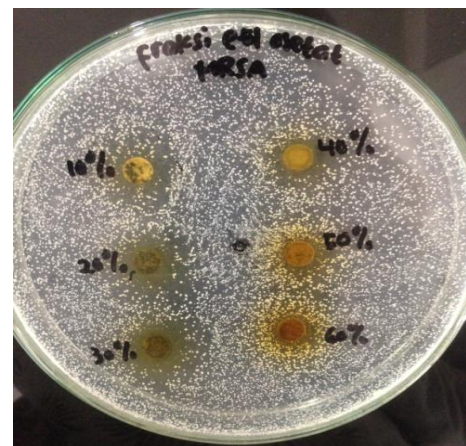
Ekstrak terhadap *Resistant S. aureus*



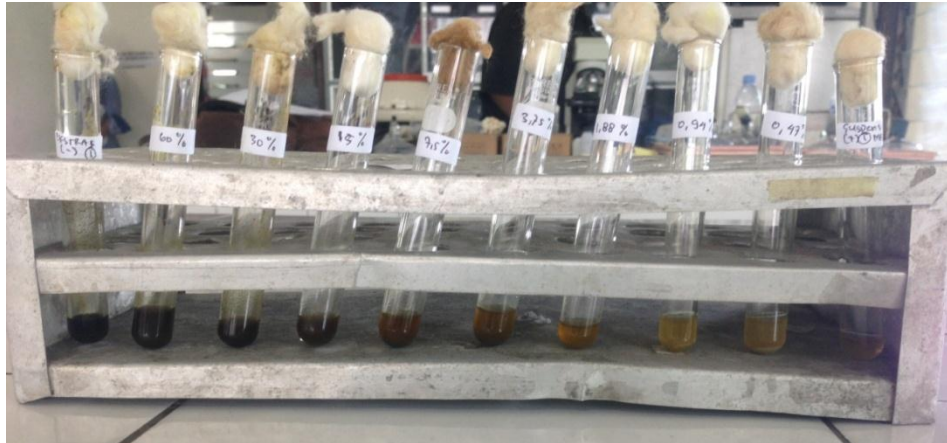
Kontrol terhadap *S. aureus*



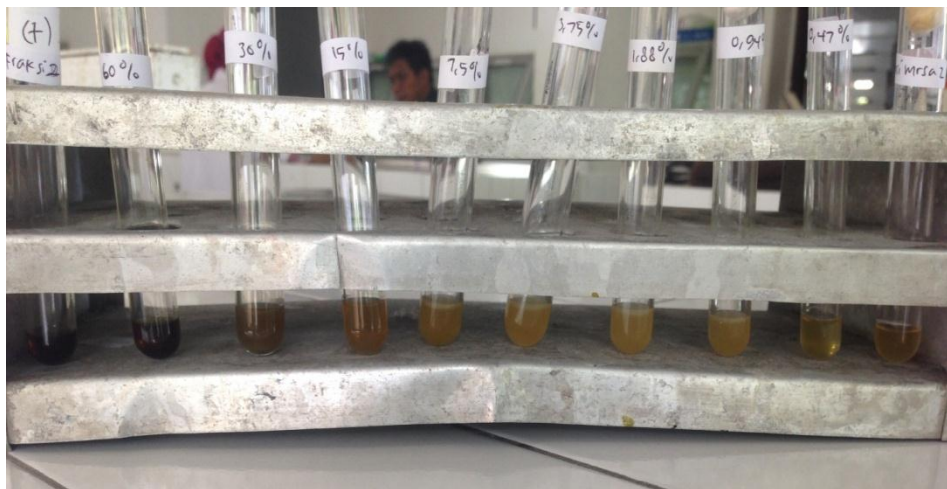
Kontrol terhadap *Resistant S. aureus*

Fraksi *n*-heksan terhadap *S. aureus*Fraksi *n*-heksan terhadap Resistant *S. aureus*Fraksi etil asetat terhadap *S. aureus*Fraksi etil asetat terhadap Resistant *S. aureus*Fraksi air terhadap *S. aureus*Fraksi air terhadap Resistant *S. aureus*

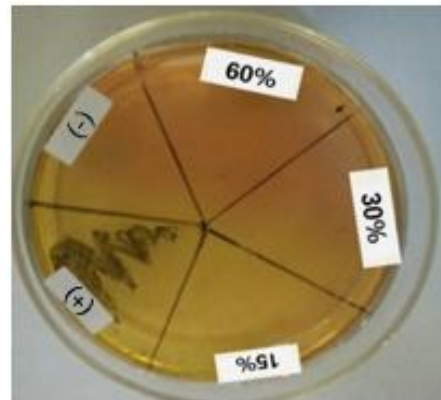
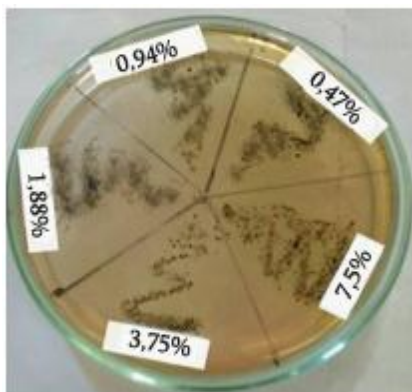
Lampiran 11. Gambar hasil dilusi dan inokulasi ekstrak etanol dan fraksi teraktif daun belimbing wuluh terhadap *S. aureus* resisten



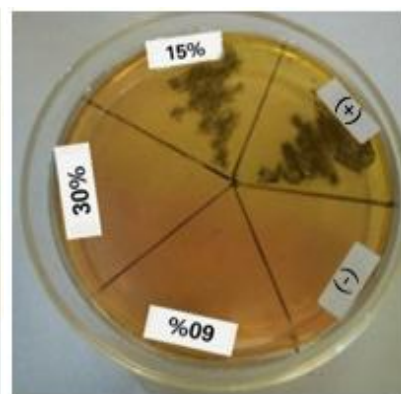
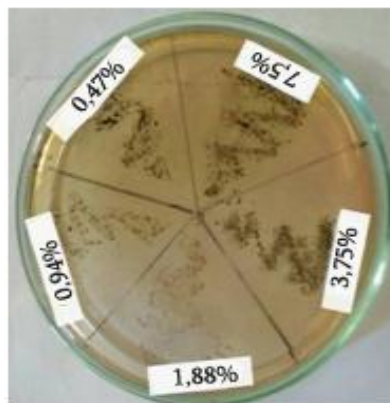
Hasil dilusi ekstrak etanol terhadap *Resistant S. aureus*



Hasil dilusi fraksi teraktif (etil asetat) terhadap *Resistant S. aureus*



Hasil inokulasi ekstrak terhadap *Resistant S. aureus*



Hasil inokulasi fraksi teraktif (etil asetat) terhadap *Resistant S. aureus*

Lampiran 12. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh, persen rendemen kadar lembab serbuk, persen rendemen ekstrak daun belimbing wuluh persen rendemen fraksi daun belimbing wuluh

Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh

No.	Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Persentase (%)
1.	6400	1000	15,62

$$\begin{aligned}
 \text{Perhitungan persentase bobot kering} &= \frac{\text{bobot kering (kg)}}{\text{bobot basah (kg)}} \times 100\% \\
 &= \frac{1000}{6400} \times 100\% \\
 &= 15,62\%
 \end{aligned}$$

Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun belimbing wuluh

No	Bobot awal (gram)	Bobot akhir (gram)	Susut pengeringan serbuk(%)
1	2	1,91	7,3
2	2	1,92	7,2
3	2	1,92	7,3
Rata-rata			7,26

Persen rendemen ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Serbuk daun belimbing wuluh (gram)	Ekstrak kental (gram)	Rendemen ekstrak (%)
1000	137,65	13,76

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Rendemen ekstrak} &= \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{137,65}{1000} \times 100\% \\
 &= 13,76\%
 \end{aligned}$$

Persen rendemen fraksinasi daun belimbing wuluh

Nama Pelarut	Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Persen rendemen fraksi (%)
<i>N</i> - heksan	30	2,04	6,8
Etil asetat	30	3,58	11,93
Air	30	6,45	21,5

$$\text{Perhitungan rendemen fraksi} = \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

1. Fraksi *n*-heksan

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen fraksi} &= \frac{2,04}{30} \times 100\% \\ &= 6,8\% \end{aligned}$$

2. Fraksi etil asetat

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen fraksi} &= \frac{3,58}{30} \times 100\% \\ &= 8,6\% \end{aligned}$$

3. Fraksi air

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen fraksi} &= \frac{6,45}{30} \times 100\% \\ &= 21,5\% \end{aligned}$$

**Lampiran 13. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil
asetat, dan air metode difusi**

1. Konsentrasi 60 %

Menimbang 1 gram ekstrak dilarutkan dengan DMSO 1 % sampai 2 mL

2. Konsentrasi 50 %

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

$$V_1 \cdot 60\% = 1 \text{ mL} \cdot 50\%$$

$$V_1 \cdot 60\% = 50\%$$

$$V_1 = \frac{50\%}{60\%}$$

$$V_1 = 0,8 \text{ mL}$$

Dipipet 0,8 mL dari sediaan awal (60%) kemudian ditambah DMSO 1% sampai 1 mL

3. Konsentrasi 40 %

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

$$V_1 \cdot 50\% = 1 \text{ mL} \cdot 40\%$$

$$V_1 \cdot 50\% = 40\%$$

$$V_1 = \frac{40\%}{50\%}$$

$$V_1 = 0,8 \text{ mL}$$

Dipipet 0,8 mL dari sediaan awal (50%) kemudian ditambah DMSO 1% sampai 1 mL

4. Konsentrasi 30 %

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

$$V_1 \cdot 40\% = 1 \text{ mL} \cdot 30\%$$

$$V_1 \cdot 40\% = 30\%$$

$$V_1 = \frac{30\%}{40\%}$$

$$V_1 = 0,8 \text{ mL}$$

Dipipet 0,8 mL dari sediaan awal (40%) kemudian ditambah DMSO 1% sampai 1 mL

5. Konsentrasi 20 %

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

$$V_1 \cdot 30\% = 1 \text{ mL} \cdot 20\%$$

$$V_1 \cdot 30\% = 20\%$$

$$V_1 = \frac{20\%}{30\%}$$

$$V_1 = 0,7 \text{ mL}$$

Dipipet 0,7 mL dari sediaan awal (30%) kemudian ditambah DMSO 1% sampai 1 mL

6. Konsentrasi 10 %

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

$$V_1 \cdot 20\% = 1 \text{ mL} \cdot 10\%$$

$$V_1 \cdot 20\% = 10\%$$

$$V_1 = \frac{10\%}{20\%}$$

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

Dipipet 0,5 mL dari sediaan awal (20%) kemudian ditambah DMSO 1% sampai 1 mL

Lampiran 14. Pembuatan konsentrasi fraksi etil asetat metode dilusi

Fraksi etil asetat daun belimbing wuluh

Menimbang 3 gram fraksi etil asetat dalam vial dilarutkan dengan 6 mL DMSO 1%

No	Konsentrasi (%)	V1	C1	V2	C2	Keterangan
1	60	-	-	-	-	1 mL larutan stok
2	60	0,5	-	-	-	1 mL larutan stok
3	30	0,5	60	1	30	0,5 mL tab.2 + BHI ad 1 mL
4	15	0,5	30	1	15	0,5 mL tab.3 + BHI ad 1 mL
5	7,5	0,5	15	1	7,5	0,5 mL tab.4 + BHI ad 1 mL
6	3,75	0,5	7,5	1	3,75	0,5 mL tab.5 + BHI ad 1 mL
7	1,88	0,5	3,75	1	1,88	0,5 mL tab.6 + BHI ad 1 mL
8	0,94	0,5	1,88	1	0,94	0,5 mL tab.7 + BHI ad 1 mL
9	0,47	0,5	0,94	1	0,47	0,5 mL tab.8 + BHI ad 1 mL
10	-	-	-	-	-	1 mL suspensi bakteri

Keterangan :

Tabung 1 = kontrol negatif

Tabung 3 = konsentrasi 30%

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

$$V_1 \cdot 30\% = 1 \text{ ml} \cdot 15\%$$

$$V_1 \cdot 30\% = 15\%$$

$$V_1 = \frac{15\%}{30\%}$$

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

Tabung 9 diperoleh dari 0,5 ml tabung 8 ditambah BHI 0,5 ml kemudian di homogenkan dan dibuang 0,5 ml.

Tabung 10 = kontrol positif suspensi bakteri 1 mL

Tabung 2 – 9 ditambah 0,5 ml suspensi bakteri

Lampiran 15. Formulasi dan pembuatan media

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

Brain infusion	12,5 gram
Heart infusion	5,0 gram
Proteose peptone	10,0 gram
Glucose	2,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
di-sodium hydrogen phosphate	2,5 gram

BHI ditimbang sebanyak 37 gram, dilarutkan dalam Aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

b. Formulasi dan pembuatan *Vogel jhonson Agar* (VJA)

Peptone from casein	10,0 gram
Yeast extract	5,0 gram
di-potasium hydrogen phosphate	10,0 gram
D(-)mannitol	10,0 gram
Lithium chloride	5,0 gram
Glycine	10,0 gram
Phenol red	0,025 gram
Agar	13,0 gram

VJA ditimbang sebanyak 61 gram, dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.

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

Beef extract	2,0 gram
Acid Hydrolysate of casein	17,5 gram
Starch	1,5 gram
Agar	17,0 gram

MHA ditimbang sebanyak 38 gram, dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.

d. Formulasi dan pembuatan agar darah

3 tetes darah domba dimasukkan dalam cawan petri steril, ditambah 10 ml media *Nutrient Agar* yang telah dicairkan secara aseptis, ratakan sampai homogen dan diamkan sampai media menjadi padat.

Formulasi *Nutrient Agar* (NA)

Ekstrak daging sapi 3,0 gram

Pepton 5,0 gram

Agar 15,0 gram

Lampiran 17. Tabel hasil uji dengan metode difusi dengan berbagai replikasi

1. *S. aureus* yang resisten

Perlakuan	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata	SD
Kontrol negatif	0	0	0	0	0
Kontrol positif	24	25	25	25	0,5
Kontrol pembanding 1	0	0	0	0	0
Kontrol pembanding 2	0	0	0	0	0
Ekstrak 10%	0	0	0	0	0
Ekstrak 20%	8	8	7	8	0,5
Ekstrak 30%	9	9	9	9	0
Ekstrak 40%	9,4	10	10	9,8	0,3
Ekstrak 50%	11	11	10	11	0,5
Ekstrak 60%	12	11	12	12	0,5
Fraksi n-heksan 10%	0	0	0	0	0
Fraksi n-heksan 20%	6	6	5	6	0,5
Fraksi n-heksan 30%	6	5	6	6	0,5
Fraksi n-heksan 40%	5	6	6	6	0,5
Fraksi n-heksan 50%	7	7	7,3	7,1	0,1
Fraksi n-heksan 60%	7	8	8	8	0,5
Fraksi etil asetat 10%	8	9	9	9	0,5
Fraksi etil asetat 20%	10	9	10	10	0,5
Fraksi etil asetat 30%	10	10	9	10	0,5
Fraksi etil asetat 40%	10	11	10,2	10,4	0,5
Fraksi etil asetat 50%	11	10	11	11	0,5
Fraksi etil asetat 60%	11	11	11	11	0
Fraksi air 10%	0	0	0	0	0
Fraksi air 20%	0	0	0	0	0
Fraksi air 30%	0	0	0	0	0
Fraksi air 40%	0	0	0	0	0
Fraksi air 50%	0	0	0	0	0
Fraksi air 60%	0	0	0	0	0

2. *S. aureus*

Perlakuan	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata	SD
Kontrol negatif	0	0	0	0	0
Kontrol positif	14	14	13	14	0,5
Kontrol pembanding 1	12	11	12	12	0,5
Kontrol pembanding 2	10	11	11	11	0,5

Ekstrak 10%	9	9	8	9	0,5
Ekstrak 20%	10	10	10	10	0
Ekstrak 30%	11	11	10	11	0,5
Ekstrak 40%	10	10,9	10	10,3	0,5
Ekstrak 50%	11	11,4	11,2	11,2	0,2
Ekstrak 60%	15	14	15	15	0,5
Fraksi n-heksan 10%	0	0	0	0	0
Fraksi n-heksan 20%	0	0	0	0	0
Fraksi n-heksan 30%	7	6,2	6	6,4	0,5
Fraksi n-heksan 40%	6	6	5	6	0,5
Fraksi n-heksan 50%	6	5	6	6	0,5
Fraksi n-heksan 60%	7	8	8	8	0,5
Fraksi etil asetat 10%	9	8,1	9	8,7	0,5
Fraksi etil asetat 20%	9	9	8	9	0,5
Fraksi etil asetat 30%	10	10	11	10	0,5
Fraksi etil asetat 40%	11	11	11	11	0
Fraksi etil asetat 50%	12	11	12	12	0,5
Fraksi etil asetat 60%	11	12	12	12	0,5
Fraksi air 10%	0	0	0	0	0
Fraksi air 20%	0	0	0	0	0
Fraksi air 30%	0	0	0	0	0
Fraksi air 40%	0	0	0	0	0
Fraksi air 50%	0	0	0	0	0
Fraksi air 60%	0	0	0	0	0