

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL FRAKSI *n*-HEKSAN,  
ETIL ASETAT DAN AIR DARI DAUN MURBEI (*Morus alba* L.)  
TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922**



**Oleh:**

**Kristina Erni Sanul  
20144212A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL FRAKSI *n*-HEKSAN,  
ETIL ASETAT DAN AIR DARI DAUN MURBEI (*Morus alba* L.)  
TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922**

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



**Oleh :**

**Kristina Erni Sanul**  
**20144212A**

**FAKULTAS FARMASI**  
**UNIVERSITAS SETIA BUDI**  
**SURAKARTA**  
**2018**

**PENGESAHAN SKRIPSI**

Berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSAN,  
ETIL ASETAT DAN AIR DARI DAUN MURBEI (*Morus alba* L.)  
TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922**

Oleh :

**Kristina Erni Sanul  
20144212A**

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada tanggal : 21 April 2018

Mengetahui,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi



Dekan,

Prof. Dr. KANA Octari, SU., MM., M.Sc., Apt.

Pembimbing,

Dr. Drs. Supriyadi, M.Si.

Pembimbing Pendamping,

Dra. Kartinah Wirjosoendjojo, SU.

Penguji :

1 Dra. Nony Puspawati, M.Si.

2 Destik Wulandari, S.Pd., M.Si.

3 Ghani Nurfiana, M.Farm., Apt.

4 Dr. Drs. Supriyadi, M.Si.

1.....  
2.....  
3.....  
4.....

## HALAMAN PERSEMBAHAN

*“Berpeganglah pada petunjuk-petunjukku maka engkau akan hidup”*

*Amsal 4:4*

*Aku menyangka dalam kebingunganku “aku telah terbuang dari hadapan matamu.” Tetapi sesungguhnya engkau mendengar suara permohonanku, ketika aku berteriak kepadamu minta tolong.*

*Mazmur 31:23*

*“Berdirilah teguh, jangan goyah, dan giatlah selalu dalam pekerjaan Tuhan ! Sebab kamu tahu, bahwa dalam persekutuan dengan Tuhan jerih payahmu tidak sia-sia.”*

*1KOR 15:58*

*“Sebab bagi Allah tidak ada yang mustahil.”*

*Lukas 1:37*

*Skripsi ini kupersembahkan kepada:*

*Tuhan Yesus Kristus.*

*Bapa, Mama, adik tercinta yang telah mendukung dan mendoakanku, tanpa doa, kasih sayang, nasehat, bimbingan dari kalian mungkin saya bukan apa-apa, terimakasih.*

*Sahabat - sahabatku tercinta khususnya kk Lia  
Teman - teman seperjuangan Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi Surakarta.  
Almamater, Bangsa dan Negara.*

## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu 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, 21 April 2018



Kristina Erni Sanul

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah Bapa di surga yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI DAUN MURBEI (*Morus alba* L.) TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* ATCC 25922 ”**. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, untuk itu penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada :

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM.,M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Dr. Drs. Supriyadi, M.Si., selaku Dosen pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, arahan, nasehat, dan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Dra.Kartinah WS, SU.,selaku dosen pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan koreksi pada penulis.
5. Tim penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan dan saran yang membangun untuk memperbaiki skripsi ini.
6. Segenap Dosen, Karyawan Dan Staf Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas setia Budi yang telah banyak membantu bagi kelancaran pelaksanaan skripsi ini.
7. Perpustakaan Universitas Setia Budi, tempat mencari sumber buku untuk menyelesaikan dan menyempurnakan skripsi ini.
8. Berbagai pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kelemahan dalam menyusun skripsi ini. Kritik dan saran dari siapapun yang bersifat membangun

sangat penulis harapkan. Akhir kata semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca supaya bisa menambah pengetahuan.

Surakarta, 21 April 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
PENGESAHAN SKRIPSI .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
PERNYATAAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
ABSTRACT .....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian .....	3
D. Kegunaan Penelitian.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
A. Tanaman Daun Murbei.....	5
1. Klasifikasi tanaman .....	5
1.1 Nama umum/nama dagang .....	5
1.2 Nama lain.....	5
2. Deskripsi tanaman .....	5
3. Syarat Tumbuhan Tanaman Murbei.....	5
4. Sifat kimiawi dan efek farmakologis.....	6
5. Khasiat Daun Murbei .....	6
6. Kandungan kimia .....	6
6.1 Flavonoid.....	6
6.2 Alkaloid.....	7
6.3 Polifenol.....	7
6.4 Terpenoid.....	8
E. Simplisia .....	8

1.	Pengertian simplisia .....	8
2.	Pengambilan simplisia.....	9
3.	Pengeringan .....	9
F.	Ekstraksi .....	9
1.	Pengertian ekstraksi.....	9
2.	Metode ekstraksi .....	10
2.1.	Maserasi.....	10
2.2.	Fraksinasi.....	10
3.	Larutan penyari .....	10
3.1	<i>n</i> -heksan.....	11
3.2	Etil asetat.....	11
3.3	Air.....	11
3.4	Etanol 70%.....	11
G.	Antibakteri.....	12
1.	Penghambatan metabolisme sel bakteri.....	12
2.	Penghambatan sintesis dinding sel.....	12
3.	Perubahan permeabilitas membran sel bakteri .....	12
4.	Penghambatan sintesis protein sel bakteri.....	13
5.	Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein .....	13
H.	Kotrimoksazol.....	13
I.	Uji Aktivitas Antibakteri .....	14
J.	Media Bakteri .....	15
1.	Media padat.....	15
2.	Media cair .....	15
3.	Media semi cair atau padat .....	15
K.	Sterilisasi .....	16
L.	<i>Escherichia coli</i> .....	16
1.	Sistematika.....	16
2.	Morfologi dan sifat <i>Esherichia coli</i> .....	16
3.	Identifikasi <i>Escherichia coli</i> .....	17
M.	Landasan Teori.....	17
N.	Hipotesis .....	19
BAB III METODE PENELITIAN.....		21
A.	Populasi dan sampel.....	21
B.	Variabel Penelitian.....	21
1.	Identifikasi variabel utama .....	21
2.	Klasifikasi Variabel utama .....	21
3.	Definisi operasional variable utama .....	22
C.	Alat dan Bahan.....	23
1.	Alat .....	23
2.	Bahan.....	23
D.	Jalannya Penelitian.....	23
1.	Determinasi tanaman.....	23
2.	Pengambilan bahan .....	24
3.	Pembuatan serbuk .....	24

4.	Penetapan kadar lembab .....	24
5.	Pembuatan ekstrak etanol .....	24
6.	Tes bebas etanol ekstrak daun murbei.....	25
7.	Penetapan persen rendemen.....	25
8.	Pengujian kandungan senyawa kimia.....	25
8.1	Flavonoid. ....	25
8.2	Alkaloid. ....	25
8.3.	Polifenol.....	25
8.4.	Terpenoid. ....	25
9.	Fraksinasi dari ekstrak etanol daun murbei .....	26
9.1	Pembuatan fraksi <i>n</i> -Heksan daun murbei.....	26
9.2.	Fraksinasi etil asetat dari daun murbei ( <i>Morus alba</i> L.).....	26
9.3.	Fraksinasi air daun murbei ( <i>Morus alba</i> L.).....	26
10.	Sterilisasi.....	26
11.	Identifikasi <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	26
11.1	Isolasi bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	26
11.2	Identifikasi mikroskopis .....	27
11.3.	Identifikasi <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan uji biokimia. ....	27
12.	Pembuatan suspensi bakteri uji .....	28
13.	Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari <i>n</i> - heksan, etil asetat, dan air dari daun murbei ( <i>Morus alba</i> L.) secara difusi.....	28
14.	Pengujian aktivitas antibakteri daun murbei secara dilusi.....	29
15.	Analisis data.....	30
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....		34
A.	Hasil Penelitian .....	34
1.	Determinasi tanaman daun murbei ( <i>Morus alba</i> L.).....	34
2.	Pembuatan serbuk daun murbei .....	34
3.	Penetapan kadar lembab serbuk daun murbei.....	35
4.	Pembuatan ekstrak etanol daun murbei.....	35
5.	Uji bebas etanol ekstrak etanol daun murbei .....	36
6.	Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun murbei .....	36
7.	Hasil fraksi ekstrak etanol daun murbei .....	38
7.1	Hasil fraksi <i>n</i> - heksan .....	38
7.2	Hasil fraksi etil asetat.....	38
7.3	Hasil fraksi air. ....	39
8.	Hasil identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	39
8.1	Hasil isolasi bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	39
8.2	Hasil identifikasi mikroskopis .....	40
8.3	Hasil identifikasi <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan uji biokimia. ....	40
9.	Pembuatan suspensi bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	42

10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun murbei ( <i>Morus alba</i> L.) secara difusi .....	43
11. Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun murbei ( <i>Morus alba</i> L.) secara dilusi .....	47
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	49
A. Kesimpulan .....	49
B. Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA .....	50
LAMPIRAN .....	55

## DAFTAR GAMBAR

Halaman

- Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun murbei (*Morus alba* L.) ..... 31
- Gambar 2. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak daun murbei terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi..... 32
- Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif( *n*-heksan, etil asetat dan air )dari ekstrak daun murbei terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode dilusi. .... 33

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun murbei .....	34
Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun murbei .....	35
Tabel 3. Rendemen ekstrak daun murbei.....	36
Tabel 4. Uji bebas etanol ekstrak daun murbei.....	36
Tabel 5. Identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi daun murbei.....	37
Tabel 6. Rendemen hasil fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan fraksi air daun murbei .....	39
Tabel 7. Identifikasi uji biokimia pada <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	41
Tabel 8. Hasil uji aktivitas antibakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 metode difusi .....	44
Tabel 9. Hasil aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak daun murbei terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	48

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil determinasi daun murbei ( <i>Morus alba</i> L.) .....	56
Lampiran 2. Foto daun murbei dan serbuk daun murbei .....	57
Lampiran 3. Foto ekstrak daun murbei, fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat dan air .....	57
Lampiran 4. Foto identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi daun murbei .....	58
Lampiran 5. Foto hasil identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	59
Lampiran 6. Foto pengenceran ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -Heksan, etil asetat dan air.....	60
Lampiran 7. Foto alat <i>Moisture balance</i> , evaporator dan corong pisah, timbangan, oven, vortex, autoklaf, inkas, inkubator, mikroskop.....	60
Lampiran 8. Pengenceran difusi ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat, air, kontrol negatif dan kontrol positif dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5% .....	62
Lampiran 9. Foto hasil uji dilusi fraksi teraktif terhadap <i>Escherichia coli</i> .....	63
Lampiran 10. Perhitungan presentase bobot kering terhadap bobot basah daun murbei .....	64
Lampiran 11. Perhitungan penetapan kadar lembab serbuk daun murbei .....	64
Lampiran 12. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun murbei .....	64
Lampiran 13. Hasil fraksi ekstrak etanol daun murbei .....	65
Lampiran 14. Perhitungan kotrimoksazol .....	66
Lampiran 15. Perhitungan pengenceran DMSO 3% ( <i>Dimethyl Sulfoxida</i> ) .....	67
Lampiran 16. Pembuatan sediaan untuk uji difusi dan dilusi .....	67
Lampiran 17. Formulasi dan pembuatan media .....	70
Lampiran 18. Analisis data uji Anova antara ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -Heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dengan konsentrasi 50%, 25%, 12.5% pada bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	73

## INTISARI

**SANUL, KRISTINA., 2018. UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN MURBEI (*Morus alba* L.) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922, SKRIPSI FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA**

Daun murbei (*Morus alba* L) mempunyai kandungan kimia, flavonoid, alkaloid, polifenol dan terpenoid yang diduga memiliki aktivitas antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun murbei (*Morus alba* L.) menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Daun murbei diekstraksi menggunakan etanol 70% lalu difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Ekstrak dari hasil fraksi diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% dan kontrol positif kotrimoksazol dan kontrol negatif DMSO 3%. Metode dilusi menggunakan seri pengenceran 50%, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,12%. 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19 %, 0,09%, kontrol – dan kontrol +

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri terbaik dibandingkan fraksi *n*-heksan, fraksi air, dan ekstrak etanol daun murbei. Aktivitas terbaik pada fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun murbei pada konsentrasi 50% dengan zona hambat 22,67 mm menggunakan metode difusi. KBM fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun murbei dapat membunuh *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah konsentrasi 3,12% menggunakan metode dilusi.

---

Kata kunci : Daun murbei, fraksinasi, antibakteri, *Escherichia coli* ATCC 25922

## ABSTRACT

**SANUL, KRISTINA., 2018, ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF n-HEXANE, ETHYL ACETATE AND WATER FRACTIONS FROM ETHANOLIC EXTRACT OF MULBERRY (*Morus alba* L.) LEAF AGAINST *Escherichia coli* ATCC 25922. THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.**

Mulberry (*Morus alba* L) leaf have chemical contents of flavonoid, alkaloid, polyphenol and terpenoids suspected of having antibacterial activity. This study is aims to determine the ability of ethanol extract, fraction of *n*-hexane, ethyl acetate and water from the Mulberry leaf (*Morus alaba* L.) against *Escherichia coli* ATCC 25922

Mulberry leaf extracted using method with 70% ethanol and then fractionated using *n*-hexane, ethyl acetate and water. Extract and the result of fractions tested the antibacterial using diffusion and dilution method. Diffusion method with a concentration of 50%, 25%, 12.5% and a positive control cotrimoxazole and negative control DMSO 3%. Dilution method using serial dilutions of 50%, 25 %, 12.5 %, 6.25 %, 3.12%. 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.1 %, 0.09, control positive and control negative

The result of this study show that the fraction of ethyl acetate has the best antibacterial activity than the *n*-hexane fraction, water fraction and leaf ethanol extract of mulberry leaf. The best activity in ethyl acetate fraction of the ethanol extract of mulberry leaf at concentration of 50%, with inhibition 22.67 mm diffusion method. MKC fraction of ethyl acetate extract of bougainvillea leaf ethanol to kill *Escherichia coli* ATCC 25922 is a concentration of 3.12% dilution method.

---

Keyword: Mulberry leaf, fractionation, antibacterial, *Escherichia coli* ATCC 25922

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Penyakit infeksi adalah jenis penyakit yang disebabkan oleh bakteri, dan salah satu jenis penyakit yang sering diderita oleh penduduk negara berkembang (Radji, 2011). Tingkat penyebaran penyakit infeksi pada manusia di Indonesia sangat tinggi karena didukung oleh iklim tropis yang sangat menguntungkan bagi pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme, khususnya mikroorganisme patogen yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia dan tanaman (Purwanto, 2008). Tubuh kita sepanjang waktu terpapar dengan virus, jamur, parasit dan bakteri. Banyak dari agen infeksi menyebabkan kelainan fungsi fisiologi yang serius atau bahkan kematian, bila agen infeksi menyerang tubuh sampai organ dalam. Selain terpapar infeksi yang bersifat patogen, kita juga sering terpapar infeksi oleh flora normal dengan kadar yang berlebihan, hal ini dapat menyebabkan penyakit akut yang mematikan misalnya infeksi *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp* (Romas *et al.* 2015)

*Escherichia coli* adalah salah satu jenis bakteri Gram negatif. *Escherichia coli* banyak ditemukan di usus besar manusia sebagai flora normal. Bakteri ini dapat berubah menjadi patogen jika pertumbuhan di dalam tubuh melebihi batas normal, akibat perubahan makanan secara mendadak serta perubahan pH dalam usus misalnya diare, dan juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain (Cahyono 2013).

Cara mengatasi penyakit infeksi yang paling umum adalah dengan terapi antibiotik. Antibiotik adalah zat yang menghancurkan atau menghalangi pertumbuhan mikroorganisme penyebab penyakit. Perkembangan resistensi *Escherichia coli* terhadap antibiotik semakin meluas sehingga untuk pengobatannya diperlukan alternatif lain (Nurmala (2015).

Tanaman yang berpotensi dikembangkan sebagai antibakteri adalah daun murbei (*Morus alba* L.) Daun murbei bermanfaat untuk mengobati beberapa penyakit seperti diuretik, ant demam dan antihipertensi (Permadi, 2006).

Kandungan kimia daun murbei yang diduga memiliki aktivitas antibakteri adalah flavonoid, alkaloid, polifenol dan terpenoid. Flavonoid dapat mengganggu metabolisme energi yang dibutuhkan oleh bakteri sehingga pertumbuhan bakteri terhambat (Chusnie & Lamb 2005). Alkaloid memiliki mekanisme penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Juliantina 2008). Polifenol memiliki mekanisme sebagai antibakteri dengan mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga permeabilitas dinding sel bakteri dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim (Juliantina 2008). Terpenoid memiliki mekanisme kerja menghambat pertumbuhan dengan mengganggu proses terbentuknya membran dan atau dinding sel, membran dan atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Ajizah, 2004).

Penelitian yang dilakukan Jurian melaporkan ekstrak etanol daun murbei dalam beberapa macam konsentrasi dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli*. Penghambatan pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli* ditunjukkan dengan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dengan menggunakan beberapa konsentrasi, yaitu 0 mg/ml; 3,85 mg/ml; 7,69 mg/ml; 15,38 mg/ml; 30,77 mg/ml. Nilai KHM dan KBM penghambatan terhadap *Escherichia coli* sebesar 11,43 mg/ml dan 3,44 mg/ml.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dan fraksinasi. Metode maserasi merupakan suatu metode penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Etanol digunakan sebagai cairan penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, kurkumin, kumarin, antrakinon, flavonoid, steroid dan klorofil (Depkes 1986). Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan terhadap pemanasan ataupun tidak tahan pemanasan (Depkes RI, 2000). Keuntungan cara maserasi adalah pengerjaan

dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diperoleh. Kerugian cara maserasi adalah pengerjaan lama dan hasil penyarian kurang sempurna. Setelah didapatkan ekstrak daun murbei dilakukan fraksinasi. Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan senyawa utama dengan senyawa utama yang lainnya berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawanya yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (Tiwari *et al.*, 2011)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi *n*-heksan, etil asetat dan fraksi air ekstrak etanolik daun murbei yang berpotensi sebagai antibakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan metode difusi kemudian dilanjutkan dengan metode dilusi. Metode difusi adalah metode dengan sumuran dipergunakan untuk mengukur daya hambatan obat oleh organism uji. Tujuan menggunakan metode dilusi adalah untuk mendapatkan Konsentrasi Bunuh Maksimum (KBM) dari fraksi *n*-heksan,etil asetat, dan air hasil fraksinasi ekstrak etanolik daun murbei (*Morus alba* L.)

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian latar belakang diatas maka perumusan masalah dalam penelitaian ini sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak etanol, fraksi *n*- heksan, etil asetat dan air dari daun murbei memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922?
2. Manakah dari fraksi fraksi *n*- heksan, etil asetat dan air dari ekstrak daun murbei yang paling aktif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922?
3. Berapakah Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun murbei yang terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922?

## **C. Tujuan Penelitian**

1. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*- heksan, etil asetat dan air dari daun murbei terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922

2. Mengetahui antara ketiga fraksi (*n*- heksan, etil asetat dan air) dari ekstrak etanol daun murbei yang paling aktif dalam menghambat *Escherichia coli* ATCC 25922.
3. Mengetahui nilai KHM dan KBM dari fraksi teraktif ekstrak etanol daun murbei terhadap *Escherichia coli* ATTCC 2592.

#### **D. Kegunaan Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, informasi khususnya tentang obat tradisional yang dapat digunakan sebagai masukan bagi masyarakat dalam upaya pemanfaatan daun murbei (*Morus alba* L) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, sehingga peranannya sebagai tanaman obat akan lebih berarti. Penelitian ini diharapkan berguna bagi peneliti lain sebagai acuan atau tambahan informasi dalam melakukan penelitian terhadap daun murbei sebagai antibakteri.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tanaman Daun Murbei**

##### **1. Klasifikasi tanaman**

Tumbuhan murbei dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledone
Bangsa	: Urticales
Keluarga	: Moraceae
Marga	: Morus
Jenis	: <i>Morus alba</i> L.

##### **1.1 Nama umum/nama dagang : Murbei**

**1.2 Nama lain:** Murbei dikenal dengan berbagai nama seperti: besaran (Indonesia), mubai, besaran (Jawa), kerta, kitau (Sumatra), sangye (Cina), maymon, dau tam (Vietnam) (Dalimarta 2000).

##### **2. Deskripsi tanaman**

Tanaman murbei memiliki tinggi mencapai 9 m, bercabang banyak. Daun tunggal dan bertangkai dengan letak berseling, berbentuk bulat telur, berujung runcing, berpangkal tumpul, tepi bergerigi, serta permukaan kasar. Bunga menjemuk berbentuk tanda keluar dari ketiga daun. Makota bunga berwarna putih. Buahnya berupa buah buni, berair dan rasanya enak. Kulit buah saat masih muda hijau, kemudian berubah merah, dan saat masak kehitaman. Tanaman ini sering dijumpai di daerah dataran rendah maupun dataran tinggi yang cukup mendapatkan sinar matahari (Atmosoedarjo *et al* 2000).

##### **3. Syarat Tumbuhan Tanaman Murbei**

Tanaman murbei sangat cocok ditanam pada lahan terbuka, karena membutuhkan banyak cahaya untuk dapat tumbuh. Tanaman ini baik tumbuh di dataran rendah maupun di dataran tinggi (Atmosoedarjo *et al* 2000). Murbei tumbuh baik di ketinggian 100 m di atas permukaan laut. Pertumbuhan murbei

pada daerah tropis berlangsung setiap tahun tanpa mengalami masa istirahat, sedangkan di daerah subtropis pada musim dingin mengalami masa istirahat dan pertumbuhannya berhenti. Tanaman murbei di daerah tropis pada saat musim kemarau produksinya menurun dibandingkan produksi pada musim hujan. Hal ini disebabkan oleh faktor air sehingga mengakibatkan produksi daun pada musim kemarau menurun, kecuali pada perkebunan murbei yang mendapat pengairan. Daun murbei dapat dipanen sepanjang tahun, hanya mengalami penurunan pada musim kemarau. Produksi sekitar 7 ton dari produksi normal, sedangkan pada saat irigasi produksi yaitu 25 ton. Produksi optimal dicapai pada suhu 24-28°C dan kelembaban udara 65-80% (FAO, 2002).

#### **4. Sifat kimiawi dan efek farmakologis**

Daun murbei memiliki beberapa efek farmakologis antara lain bersifat diuretik, ant demam dan antihipertensi (Permadi, 2006).

#### **5. Khasiat Daun Murbei**

Khasiat lain dari daun murbei antara lain untuk penyakit seperti flu, malaria, sakit kepala, sakit tenggorokan, sakit gigi, rematik, darah tinggi (hipertensi), kencing manis (diabetes mellitus), kaki gajah, sakit kulit, bisul, radang mata merah, memperbanyak air susu ibu (ASI), keringat malam, muntah darah dan batuk darah akibat darah panas, kolesterol tinggi dan gangguan pada saluran pencernaan (Dalimartha, 2008; Hariana 2008)

#### **6. Kandungan kimia**

Penelitian sebelumnya disebutkan bahwa daun murbei mengandung alkaloid, flavonoid, dan polifenol, (Sunanto, 2009). Anita *et al.* (2014). Penelitian lain menyebutkan kandungan dalam daun murbei adalah terpenoid (Purwatresna 2012).

**6.1 Flavonoid.** Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan didalam jaringan tanaman (Arisandi 2016). Flavonoid termasuk golongan fenolik dengan struktur kimia c<sub>6</sub>-c<sub>3</sub>-c<sub>6</sub>, artinya kerangka karbonnya terdiri dari dua gugus c<sub>6</sub> (cincin benzen tersubstitusi) disambung oleh rantai alifatik tiga karbon (Redha 2010). Flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar dan larut dalam air yang dapat juga

diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap ada lapisan air setelah dikocok dengan eter minyak bumi. Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan, terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang merupakan bentuk kombinasi glikosida. Flavonoid ini terdapat dalam semua tumbuhan berpembuluh. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah jika ditambah basa atau ammonia (Octavia, 2009)

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah kemampuannya dalam membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan dinding bakteri. Akibat terganggunya dinding sel, sel tidak dapat menahan tekanan osmotik internal yang dapat mencapai 5 sampai 10 atm. Tekanan ini cukup untuk memecah sel apabila dinding sel rusak (Aziz 2010). Mekanisme kerja dengan mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Prayudhani *et al.* 2012)

**6.2 Alkaloid.** Alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih dari atom N, biasanya dalam gabungan sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid biasanya terbentuk kristal, hanya sedikit yang berupa cairan, dan dapat dideteksi dengan pereaksi dragendrof (Maharani *et al* 2014). Kemampuan senyawa alkaloid sebagai antibakteri dilakukan dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel pada bakteri tersebut (Alamsyah *et al* 2014). Kadar alkaloid dalam tanaman sangat bervariasi tergantung pada cara penanaman dan waktu panen. Alkaloid dapat menghambat esterase, DNA dan RNA polimerase serta menghambat respirasi sel dan berperan dalam interkalasi DNA. Alkaloid dapat mengganggu terbentuknya jembatan seberang silang komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Ajizah 2004).

**6.3 Polifenol.** Polifenol merupakan senyawa bioaktif pada tumbuhan yang memiliki beberapa fungsi yaitu sebagai perlindungan terhadap mikroorganisme dan serangga, antioksidan, bertanggung jawab pada pembentukan warna, dan beberapa karakteristik organoleptik pada makanan (Albuquerque *et al.*, 2013).

Polifenol memiliki spektrum luas dengan sifat kelarutan pada pelarut yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh gugus hidroksil pada senyawa tersebut berbeda jumlah dan posisinya. Polifenol banyak terdapat pada buah-buahan dan sayur-sayuran hijau. Penelitian pada hewan dan manusia menunjukkan bahwa polifenol dapat mengatur kadar gula darah seperti antikanker, antioksidan, dan antimikroba (Lenny, 2006).

**6.4 Terpenoid.** Triterpenoid merupakan senyawa berkerangka karbon dari enam satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon asiklik, yaitu skualena. Triterpenoid dibagi menjadi empat golongan senyawa yaitu triterpena, steroid, saponin, dan glikosida jantung. Terpenoid terdapat dalam senyawa tumbuhan, memiliki struktur siklik dan satu gugus fungsi atau lebih (hidroksil, karbonil, dan lain-lain). Umumnya, terpenoid larut lemak dan berada di dalam sitoplasma sel tumbuhan. Penggolongan senyawa terpenoid, berdasarkan kemudahannya dalam menguap dibagi menjadi tiga golongan, yaitu: mudah menguap (monoterpen dan seskuiterpen sebagai minyak atsiri), sulit menguap (diterpenoid), dan tidak menguap (triterpenoid dan steroid) (Direja, 2007). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan dengan mengganggu proses terbentuknya membran dan atau dinding sel, membran dan atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Ajizah, 2004).

## **E. Simplisia**

### **1. Pengertian simplisia**

Simplisia adalah bahan alam yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga, kecuali jika berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibagi menjadi 3 macam yaitu, simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia mineral. Simplisia nabati adalah simplisia berupa tanaman utuh, bagian tanaman, atau eksudat tanaman dengan tingkat kehalusan tertentu. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat yang dihasilkan hewan yang masih berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan (mineral) adalah simplisia yang berupa bahan pelikan (mineral) yang belum diolah atau

telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Depkes, 2000).

## **2. Pengambilan simplisia**

Kadar suatu senyawa dalam simplisia berbeda-beda tergantung beberapa faktor antara lain: bagian tumbuhan yang digunakan, umur tumbuhan atau bagian tumbuhan pada saat panen, waktu panen dan lingkungan tempat tumbuh. Waktu panen simplisia sangat berkaitan dengan senyawa aktif yang terkandung di dalam bagian tanaman yang akan di panen. Waktu panen yang tepat adalah ketika bagian tanaman yang akan digunakan mengandung senyawa aktif dalam jumlah yang banyak (Gunawan dan Mulyani, 2004)

## **3. Pengeringan**

Pengeringan simplisia bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam waktu yang lama. Pengeringan simplisia digunakan untuk: Menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi bakteri dan kapang. Menghilangkan aktifitas enzim yang bisa menguraikan kandungan zat aktif pada tanaman. Memudahkan dalam hal pengelolaan proses selanjutnya, mudah disimpan, dan tahan lama (Gunawan dan Mulyani, 2004).

Pada pengeringan, simplisia akan kehilangan air dalam jumlah besar. Kandungan simplisia yang telah dikeringkan dapat mencapai 10% atau lebih, tetapi disyaratkan kandungan air harus kurang dari 10%. Jika kandungan air masih terlalu tinggi atau penyimpanan dalam kondisi yang terlalu basah akan terjadi kerusakan material tumbuhan (Voight, 1994.)

## **F. Ekstraksi**

### **1. Pengertian ekstraksi**

Ekstraksi adalah sediaan kering, kental atau cair, dibuat dengan mengambil sari simplisia nabati atau hewani dengan cara yang sesuai, diluar pengaruh cahaya matahari langsung. Cairan penyari yang digunakan antara lain air, eter, atau campuran etanol dan air. Penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat menggunakan pelarut yang dipilih sehingga zat yang

diinginkan larut. Bahan mentah obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan dan dikeringkan. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi untuk memperoleh ekstrak yang sempurna dari obat. Sifat dari bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih suatu metode ekstraksi (Tiwari *et al.*, 2011).

## **2. Metode ekstraksi**

**2.1. Maserasi.** Maserasi adalah proses pengestrakkan simplisia menggunakan beberapa pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu ruangan (kamar). Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan maupun yang tidak tahan terhadap pemanasan (Depkes RI, 2000).

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung bahan aktif yang mudah larut dalam pelarut dan tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari. Penyarian dengan pelarut air bisa ditambahkan bahan pengawet (kloroform, etanol, gula, gliserin) pada awal penyarian supaya mencegah timbulnya kapang, khamir, dan kuman. Keuntungan cara maserasi adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diperoleh. Kerugian cara maserasi adalah pengerjaan lama dan hasil penyarian kurang sempurna.

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

## **3. Larutan penyari**

Penyarian ekstrak daun murbei dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan difraksinasi dengan *n*-heksan, etil asetat, dan air. Penggunaan pelarut yang berbeda polaritasnya disebabkan kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam daun murbei mempunyai polaritas yang

berbeda-beda sehingga dengan dilakukan fraksinasi akan diketahui fraksi yang paling efektif terhadap bakteri *Escherichia coli*.

**3.1 *n*-heksan.** Pelarut *n*-Heksan adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih, terdiri atas suatu campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna, transparan, bersifat mudah terbakar, baunya khas, tidak dapat larut dengan air, dapat larut dengan alkohol, benzen, kloroform, eter. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-Heksan yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti terpenoid, triterpenoid, sterol, dan fenil propanoid (Tiwari *et al.*, 2011).

**3.2 Etil asetat.** Pelarut etil asetat adalah pelarut yang bersifat semi polar, memiliki titik didih yang relatif rendah yaitu 77 °C sehingga mudah menguap (bersifat volatil), tidak beracun dan tidak berwarna serta memiliki aroma khas (Susanti 2012).

**3.3 Air.** Air adalah pelarut universal, digunakan untuk ekstraksi tanaman dengan produk aktivitas antimikroba. Air biasanya dipertimbangkan sebagai pelarut karena sifatnya yang stabil, tidak menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah. Air dapat melarutkan gula, pati, minyak menguap, lemak peptida, zat warna, garam alkaloid, dan asam organik (List, 2000)

**3.4 Etanol 70%.** Etanol digunakan sebagai cairan penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% keatas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, dapat bercampur dengan air pada berbagai perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Etanol dapat melarutkan senyawa yang memiliki berat molekul rendah seperti alkaloid, saponin dan flavonoid (Arifianti *et al.* 2014).

Pelarut etanol lebih mudah menembus membran sel untuk mengekstrak bahan intraseluler dari bahan tanaman. Karena hampir semua komponen diidentifikasi dari tanaman yang aktif terhadap mikroorganisme adalah senyawa organik aromatik atau jenuh, mereka paling sering diperoleh melalui etanol atau ekstraksi metanol. Metanol lebih polar dari pada etanol tetapi karena sifat sitotoksik, maka metanol tidak cocok untuk uji aktivitas antibakteri karena dapat menyebabkan hasil yang salah (Tiwari *et al.* 2011).

## **G. 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 terhadap hospes. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai zat bakteriostatik dan ada yang bersifat membunuh bakteri dikenal sebagai zat bakterisid. Konsentrasi zat minimum yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya masing-masing dikenal sebagai KHM dan KBM (Ganiswara,2007). Mekanisme antibakteri merupakan peristiwa penghambatan bakteri oleh antibakteri. Berdasarkan mekanisme kerjanya antibakteri dibagi dalam 5 kelompok yaitu :

### **1. Penghambatan metabolisme sel bakteri**

Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari Para Amino Benzoic Acid (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antimikroba bila bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional sehingga kebutuhan akan asam folat tidak terpenuhi dan bisa menyebabkan bakteri mati. Contoh antibakteri yang bekerja menghambat metabolisme sel bakteri adalah sulfonamide dan trimetoprin (Bakung, 2014)

### **2. Penghambatan sintesis dinding sel**

Dinding sel bakteri terdiri atas polipeptidoglikan yaitu suatu kelompok polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubah setelah terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis. Contoh antibakteri golongan antalarain penisilin, sefalosporin, fosfomisin, vankomisin, sikloserin, dan basitrain (Radji, 2002).

### **3. Perubahan permeabilitas membran sel bakteri**

Selaput 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 dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain. Beberapa jenis antibakteri dapat mengganggu membran sel sehingga mempengaruhi kehidupan sel bakteri, antara lain polimiksin, nistatin, golongan makrolida dan poliena (misal amfoterisin B) (Radji, 2002)

#### **4. Penghambatan sintesis protein sel bakteri**

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

#### **5. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein**

Antibakteri yang memiliki mekanisme kerja ini pada umumnya bersifat toksik kurang selektif, karena antibakteri ini bersifat sitotoksik terhadap sel tubuh hospes, sehingga hanya bersifat sitotoksik yang masih dapat diterima sebagai antibakteri. Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini antara lain asam nalidiksat dan golongan kuinolol (Radji, 2002).

### **H. Kotrimoksazol**

Kotrimoksazol merupakan kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol digunakan dalam bentuk kombinasi karena sifatnya sinergistik. Penggunaan kotrimoksazol pada penelitian ini karena kotrimoksazol merupakan antibiotik yang poten dan aktif dalam membunuh bakteri Gram negatif salah satunya adalah bakteri *Escherichia coli*. Trimetoprim dan sulfametoksazol menghambat reaksi enzimatik pada dua tahap yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi kedua obat memberikan efek yang sinergis. Penemuan sediaan kombinasi ini merupakan kemajuan penting dalam usaha meningkatkan efektivitas klinik mikroba. Spektrum antibakteri trimetoprim sama dengan sulfametoksazol. Mekanisme antibakterinya berdasar atas kerjanya pada tahap yang berurutan

dalam reaksi enzimatis untuk membentuk asam tetrahidrofolat. Sulfametoksazol menghambat masuknya molekul PABA ke dalam asam folat dan trimetoprim menghambat terjadinya reaksi reduksi dari dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat. Tetrahidrofolat penting untuk reaksi-reaksi pemindahan satu atom C, seperti pembentukan basa purin dan beberapa asam amino. Trimetoprim menghambat enzim dihidrofolat reduktase mikroba secara sangat selektif. Kombinasi ini mungkin efektif walaupun mikroba telah resisten terhadap trimetoprim. Sinergisme maksimum akan terjadi bila mikroba peka terhadap kedua komponen (Gunawan *et al.* 2009).

Keuntungan penting lain dari kombinasi ini adalah timbulnya resistensi lebih lambat daripada komponen-komponennya sendiri. Hal ini adalah jelas, karena bakteri yang menjadi resistensi untuk satu komponen masih dapat dimusnahkan oleh yang lain (Tjay & Rahardja 2002).

### **I. Uji Aktivitas Antibakteri**

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

Pertama, metode difusi. Metode ini dapat dilakukan dengan menggunakan cakram (*diks*) kertas saring, sumuran atau silinder tidak beralas. Metode dengan sumuran atau silinder, dilakukan dengan memasukkan larutan uji dengan konsentrasi tertentu ke dalam sumuran. Metode cakram kertas saring berisi sejumlah obat yang ditempatkan pada permukaan medium padat, medium sebelum digunakan diolesi bakteri uji. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat. Metode difusi agar dipengaruhi oleh faktor fisik 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 kuman kemudian diinkubasi dan diamati daerah media yang jernih. 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 kualitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al.* 2005)

## **J. Media Bakteri**

Media merupakan bahan yang digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangkan mikroba. Media yang digunakan harus dalam keadaan steril artinya tidak ditumbuhi oleh mikroba lain yang tidak diharapkan. Agar mikroba dapat tumbuh dan berkembang dengan baik di dalam media maka diperlukan persyaratan, antara lain dalam media harus terkandung unsur yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri, harus mempunyai tegangan permukaan dan pH sesuai dengan kebutuhan mikroba, dan harus steril (Suriawiria 1986). Bentuk media ditentukan oleh ada tidaknya penambahan zat pematat seperti agar-agar, gelatin. Bentuk media dikenal ada tiga jenis:

### **1. Media padat**

Media ditambah 12-15 gram tepung agar-agar per 1.000 ml media. Media yang memerlukan kadar air tinggi, maka jumlah tepung agar-agar harus rendah, tetapi untuk jenis media yang memerlukan kandungan air rendah penambahan tepung agar harus banyak. Media padat umumnya diperlukan untuk bakteri, ragi, jamur, dan kadang - kadang juga mikroalga

### **2. Media cair**

Media tidak ditambahkan zat pematat, biasanya media cair dipergunakan untuk perbakaan mikroalga tetapi juga mikro lain, terutama bakteri dan ragi.

### **3. Media semi cair atau padat**

Penambahan zat pematat hanya 50% atau kurang dari yang seharusnya. Umumnya diperlukan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup aerobik atau fakultatif (Suriawiria 1986 ).

## K. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang dipergunakan dalam bidang mikrobiologi harus dalam keadaan steril. Steril artinya tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang mengganggu atau merusak media atau mengganggu kehidupan dan proses yang sedang dikerjakan (Waluyo 2004). Sterilisasi merupakan suatu tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah dan kering. Sterilisasi dengan pemanasan basah menggunakan autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit untuk mensterilkan media, sedangkan sterilisasi kering menggunakan oven dengan suhu 171<sup>0</sup>C selama 2 jam untuk mensterilkan cawan petri, dan tabung reaksi. (Darmandi 2008). Penggunaan formaldehid adalah metode sterilisasi fisikokimia untuk mensterilkan inkas. (Rao, 2008).

## L. *Escherichia coli*

### 1. Sistematika

Berdasarkan taksonominya *E. coli* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Divisi	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Bangsa	: Enterobacteriales
Keluarga	: Enterobacteriaceae
Marga	: <i>Escherichia</i>
Jenis	: <i>Escherichia coli</i> (Kairupan <i>et al</i> 2014)

### 2. Morfologi dan sifat *Escherichia coli*

*Escherichia coli* adalah kuman oportunitis yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Morfologi dari *Escherichia coli* adalah berbentuk batang pendek, ukuran 0,4-0,7 µm x 1,4 µm, sebagian gerak positif dan beberapa strain mempunyai kapsul. Biakan *Escherichia coli* berupa koloni berwarna pada agar *Mac Conkey* yang menunjukkan bahwa hasil memfermentasi laktosa dan bersifat non patogen di dalam usus. Tempat paling

sering terkena infeksi *Escherichia coli* adalah saluran kemih, saluran empedu, dan tempat-tempat lain di rongga perut. Bakteri ini juga menghasilkan enterotoksin penyebab diare. *Escherichia coli* memproduksi enterotoksin yang tahan panas dapat menyebabkan diare yang ringan, sedangkan enterotoksin yang tidak tahan panas dapat menyebabkan sekresi air dan klorida ke dalam lumen usus sehingga menghambat reabsorpsi natrium (Widyarto, 2009).

### **3. Identifikasi *Escherichia coli***

Uji *Escherichia coli* dengan media Endo Agar bertujuan untuk menguji bakteri ini memfermentasi laktosa akan menghasilkan asam dan aldehid, dengan bantuan oksidasi dari udara akan memecah ikatan fuchsin dan sulfid yang ada di medium akibatnya fuchsin membentuk kilap logam dan medium menjadi merah. Uji *Escherichia coli* dengan media SIM (*Sulfida Indol Motility*) bertujuan untuk menguji adanya sulfida, indol serta motilitas. Uji sulfida positif bila medium berwarna hitam, uji indol bila terbentuk warna merah setelah penambahan reagen Erlich Adan Erlich B. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. KIA (*Kliger's Iron Agar*) bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Bagian lereng dasar, terdapat gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila bagian lereng akan berwarna hitam, bagian dasar berwarna kuning, terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media, sulfida positif terbentuk warna hitam pada media. LIA (*Lysin Iron Agar*) bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi lysine dan sulfida. Bagian lereng akan terbentuk warna hitam pada media. Uji positif bila lereng akan berwarna hitam, berwarna ungu, berwarna kuning, disertai terbentuknya warna hitam pada media. CITRAT bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru.

### **M. Landasan Teori**

Tanaman murbei (*Morus alba* L.) merupakan salah satu jenis tanaman yang berkhasiat sebagai obat. Daun murbei dapat digunakan untuk obat batuk, salesma, demam, dan hipertensi. Ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L.)

mengandung quersetin dan anthosianin. Kedua macam senyawa tersebut termasuk dalam kelompok glikosida flavonoid. Glikosida flavonoid merupakan senyawa fenol yang berperan sebagai koagulator protein (Tee Vincent 2007). Selain itu daun murbei juga mengandung senyawa alkaloid, polifenol dan tepenoid.

Tubuh kita sepanjang waktu terpapar dengan virus, jamur, parasit dan bakteri. Selain terpapar infeksi yang bersifat patogen, kita juga sering terpapar infeksi oleh flora normal dengan kadar yang berlebihan, hal ini dapat menyebabkan penyakit akut yang mematikan misalnya infeksi *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp* (Romas *et al.* 2015). Bakteri yang dapat menyebabkan infeksi adalah *Escherichia coli*. Bakteri ini kadang-kadang mengkoloni pada manusia dan menimbulkan infeksi apabila fungsi pertahanan inang abnormal. Oleh karena itu *Escherichia coli* ATCC 2592 disebut patogen oportunistik yaitu memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi.

Penelitian yang dilakukan oleh (Jurian *et al* 2016) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun murbei dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli*. Penghambatan pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli* ditunjukkan dengan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) menggunakan metode dilusi. Hasil dari penelitian tersebut diperoleh nilai KHM sebesar 11,43 mg/ml yang berarti dengan konsentrasi tersebut mampu menghambat lebih dari 90% pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan nilai KBM sebesar 3,44 mg/ml yang berarti dengan konsentrasi tersebut mampu menghambat lebih dari 50% pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Penelitian tersebut diketahui bahwa ekstrak etanol daun murbei memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* akan tetapi penelitian tersebut belum sampai tahap fraksinasi. Penelitian ini dilanjutkan sampai tahap fraksinasi sehingga dapat diketahui fraksi teraktif terhadap *Escherichia coli*.

Penyarian menggunakan metode maserasi. Keuntungan metode maserasi yaitu cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugian maserasi adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna. Berdasarkan zat aktif yang terkandung dalam daun murbei,

maka pelarut yang digunakan adalah etanol 70 %, karena etanol merupakan pelarut yang baik untuk ekstraksi pendahuluan agar diperoleh hasil yang bagus. Penyarian biasanya digunakan campuran antara etanol dan air. Etanol di pertimbangkan sebagai penyari karena etanol merupakan larutan penyari yang mudah di peroleh, stabil secara fisika dan kimia, selektif terhadap kapang dan kuman beracun, bereaksi netral, absorpsinya baik, tidak mempengaruhi zat berkhasiat, tidak mudah terbakar, panas yang dibutuhkan untuk pemekatan lebih sedikit, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan. Etanol dapat melarutkan senyawa yang memiliki berat molekul rendah seperti alkaloid, saponin dan flavonoid (Arifianti *et al.* 2014).

Fraksinasi adalah proses untuk memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan kepolarannya dalam suatu tumbuhan. Jumlah dan jenis senyawa yang setelah dipisahkan akan terjadi fraksi yang berbeda.

Dalam penelitian ini peneliti menggunakan antibiotik kotrimoksazol sebagai kontrol pembanding. Kotrimoksazol merupakan kombinasi dari trimethoprim dan sulfametataksazol yang menghambat reaksi enzimatik obligat pada mikroba, sehingga kombinasi dari dua obat tersebut memberikan efek sinergis (Gunawan *et al.* 2009)

Pengujian antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi kemudian dilanjutkan dengan metode dilusi. Metode difusi digunakan untuk mengetahui diameter zona hambatan dari fraksi teraktif, sedangkan metode dilusi digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap menggunakan media cair.

## **N. Hipotesis**

Berdasarkan landasan teori diatas, hipotesis dalam penelitian ini adalah :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*- heksan, etil asetat dan air dari daun murbei mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922

Kedua, fraksi etil asetat ekstrak daun murbei merupakan fraksi yang paling aktif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922

Ketiga, nilai Kosentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif daun murbei (*Morus alba* L.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 yaitu fraksi etil asetat.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman murbei yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah. Sampel dalam penelitian ini adalah simplisia daun murbei yang berwarna hijau tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua yang masih segar. Daun murbei diambil secara acak dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah, bulan Januari 2018.

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

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

Variabel utama dalam penelitian yang pertama adalah ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun murbei (*Morus alba* L.)

Variabel yang kedua aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun murbei (*Morus alba* L.) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

##### **2. Klasifikasi Variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan kedalam 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 yang dimaksud dalam penelitian adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun murbei (*Morus alba* L.) dalam konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,2%; 3,1%; 1,5%; 0,7%; 0,3%; 0,1%; 0,09%.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian adalah kemurnian bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, kondisi

laboratorium meliputi kondisi inkas, suhu inkubasi, waktu inkubasi, sterilisasi, media yang digunakan dalam penelitian dan metode ekstraksi.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri yang dipengaruhi oleh fraksinasi daun murbei (*Morus alba* L.) yang dilihat dari pertumbuhannya pada media selektif.

### **3. Definisi operasional variable utama**

Pertama, daun murbei (*Morus alba* L.) adalah daun tanaman yang berwarna hijau tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua yang diambil secara acak pada bulan Januari 2018 dari, Batu Malang Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun murbei (*Morus alba* L.) adalah daun murbei yang diambil kemudian dicuci pada air mengalir guna membersihkan kotoran yang masih menempel, setelah itu dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 50°C selama 3 hari, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan no 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L.) adalah hasil ekstraksi dari serbuk daun murbei yang diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah ekstrak dari etanol 70% daun murbei (*Morus alba* L.) yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan sebagai pelarut non polar.

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

Keenam, fraksi air dari daun murbei (*Morus alba* L.) adalah fraksinasi dari residu fraksi etil asetat dengan menggunakan air sebagai pelarut polar.

Ketujuh, *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah bakteri yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri adalah uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan menggunakan metode difusi untuk mengukur diameter zona hambat, metode dilusi untuk mengukur konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi 50%; 25%; 12,5 %; 6,2%; 3,1%; 1,5%; 0,7 %; 0,3 %; 0,1 %; 0,09%.

Kesembilan, 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 alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pembakar spiritus, kaki tiga, kasa, selang, corong kaca, botol maserasi, penangas air, timbangan analitik, labu erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, labu takar, autoklaf, incubator, inkas, tabung reaksi, spuit injeksi, kertas saring, kertas lakmus, dan corong kaca, oven, blender, ayakan no.40, batang pengaduk, seperangkat alat rotary evaporator, spatel.

#### 2. Bahan

**1.1. Bahan utama.** Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun murbei (*Morus alba* L.). Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 biakan murni.

**1.2. Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut *n*-heksan, etil asetat, *Mc Farland* 0,5, etanol 70%, aquadestilata, HCl, Mg, FeCl<sub>3</sub>, Erlich A, Erlich B, DMSO 3%, reagen mayer, reagen dragendrof.

**1.3. Medium.** Medium yang digunakan *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Kligler Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Citrat, Endo Agar* (EA)

### D. Jalannya Penelitian

#### 1. Determinasi tanaman

Determinasi dilakukan untuk mengetahui daun yang digunakan benar-benar daun murbei dan identitas murbei yang akan digunakan sebagai bahan uji dalam penelitian. Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman murbei

sesuai kepustakaan dan dibuktikan dibagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

## **2. Pengambilan bahan**

Sampel daun murbei yang diambil secara acak dengan memilih daun yang tidak terlalu muda juga tidak terlalu tua , masih segar dan bebas dari hama yang diambil di Batu Malang Jawa Timur, pada bulan Januari 2018.

## **3. Pembuatan serbuk**

Pembuatan serbuk daun murbei dilakukan dengan cara daun murbei (*Morus alba* L.) dicuci bersih terlebih dahulu dengan air mengalir sampai terbebas dari kotoran dan debu. Daun murbei (*Morus alba* L.) yang sudah dibersihkan ditimbang, setelah itu dioven pada suhu 50°C. Daun murbei (*Morus alba* L.) yang sudah kering diserbuk dengan alat penyerbuk kemudian diayakan dengan ayakan no 40 sehingga diperoleh serbuk daun murbei (*Morus alba* L.).

## **4. Penetapan kadar lembab**

Penetapan kadar kelembaban serbuk daun murbei pada penelitian ini dilakukan di laboratorium teknologi farmasi Universitas Setia Budi. Penetapan kadar kelembaban serbuk daun murbei dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Serbuk ditimbang 2 gram, dimasukkan ke dalam alat *moisture balance*. Kemudian *moisture balance* ditutup dan ditunggu sampai ada bunyi pada alat sebagai tanda. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat *moisture balance* dicatat sebagai kadar kelembaban. Kadar lembab memenuhi syarat dimana suhu serbuk dari simplisia tidak boleh lebih dari 10%

## **5. Pembuatan ekstrak etanol**

Serbuk daun murbei ditimbang sebanyak 800 gram kemudian dimasukkan ke dalam botol, dengan ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:7,5 (Jurian *et al* 2016). Campuran didiamkan selama 5 hari, dalam sehari digojog selama 1 jam. Maserat dan ampas dipisahkan, maserat yang didapatkan disaring, kemudian dipekatkan dengan evaporator sampai didapat maserat yang pekat.

## 6. Tes bebas etanol ekstrak daun murbei

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 etanol ditandai dengan tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol. Tujuan dilakukannya tes bebas etanol ini agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri. Identifikasi senyawa ini dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

## 7. Penetapan persen rendemen

Persen rendemen diperoleh dengan cara menimbang hasil ekstrak pekat dibagi dengan berat serbuk, kemudian dikalikan 100 %.

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

## 8. Pengujian kandungan senyawa kimia

**8.1 Flavonoid.** Ekstrak etanol dan fraksi daun murbei (*Morus alba* L.) sebanyak  $\pm 0,5$  g dicampurkan dengan aquades. Setelah itu, didihkan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 0,5 mg bubuk Mg dan ditambahkan 1 ml HCl pekat dan amil alkohol. Dicampur dan dikocok kuat-kuat kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah *et al* 2014).

**8.2 Alkaloid.** Ekstrak etanol dan fraksi sebanyak  $\pm 0,5$  g dilarutkan dengan aquades. Setelah itu ditambahkan 1 ml HCl 2 N. Dibuat dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambahkan reagen Mayer terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan. Tabung 2 ditambahkan reagen Dragendroff terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Alamsyah *et al* 2014).

**8.3. Polifenol.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol dan fraksi daun murbei, ditambahkan 10 ml air panas kemudian didihkan selama 15 menit dan disaring. Kemudian filtrat yang diperoleh ditambahkan 5 ml pereaksi besi (III) klorida. Perubahan warna biru kehitaman atau cokelat kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Robinson 1995).

**8.4. Terpenoid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol dan fraksi, dimasukkan dalam tabung, kemudian ditambah air panas 10 ml, didinginkan lalu dikocok kuat-

kuat selama 10 detik. Hasilnya ditunjukkan dengan perubahan warna hijau, biru dan merah kecolatan atau ungu (Harbone 1987)

## **9. Fraksinasi dari ekstrak etanol daun murbei**

**9.1 Pembuatan fraksi *n*-Heksan daun murbei.** Ekstrak etanol 70% sebanyak 10 g yang telah disuspensikan dengan air difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan 75 ml dalam corong pisah, fraksi yang ada diatas (fraksi *n*-heksan) dipisahkan dengan fraksi yang bagian bawah (fraksi air) dilakukan dengan penambahan *n*-heksan sebanyak 3 kali. Fraksi *n*-heksan yang didapat kemudian dipekatkan dengan oven pada suhu 40°C.

**9.2. Fraksinasi etil asetat dari daun murbei (*Morus alba L.*).** Hasil sisa fraksinasi dengan *n*-heksan difraksinasi dengan pelarut etil asetat 75 ml dalam corong pisah. Filtrat yang dibawah (fraksi air) dipisahkan dengan filtrat yang bagian atas (fraksi etil asetat), dilakukan dengan penambahan pelarut sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat yang didapat kemudian dipekatkan dengan oven pada suhu 40°C.

**9.3. Fraksinasi air daun murbei (*Morus alba L.*).** Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air. filtrat yang telah diperoleh kemudian dipekatkan dengan *water bath* sampai kental.

## **10. Sterilisasi**

Media yang digunakan dalam penelitian ini harus disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Cawan petri dan tabung reaksi disterilkan dengan oven pada suhu 170- 180 °C selama 2 jam, sedangkan alat- alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung, dan sterilisasi inkas menggunakan formalin (Suriawiria, 2005).

## **11. Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922**

**11.1 Isolasi bakteri *Escherichia coli*.** Suspensi bakteri uji *Escherichia coli* diinokulasi pada media differensial *Endo Agar* (EA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni merah dengan kilap logam. Hal tersebut disebabkan karena bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dapat memfermentasi laktosa sehingga menyebabkan warna medium *Endo Agar* disekitar koloni merah dengan kilap logam (Volk dan

Wheller 1988). *Escherichia coli* memfermentasi laktosa akan menghasilkan asam dan aldehyd, dengan bantuan oksidasi dari udara akan memecah ikatan fuchsin dan sulfit yang ada di medium, akibatnya fuchsin membentuk kilap logam dan medium menjadi merah.

**11.2 Identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian tetes kristal ungu (Gram A) sebagai pewarna utama pada kedua preparat sampai semua ulasan terwarnai, didiamkan selama  $\pm 1$  menit. Cuci dengan aquadest mengalir kemudian tetesi mordant (lugol, s iodine/ Gram B), didiamkan selama  $\pm 1$  menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C (alkohol) selama 30 detik. Tetes counterstain (safari / Gram D) dan didiamkan selama  $\pm 45$  detik, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian dikeringkan, preparat dengan kertas tisu yang ditempelkan disisi ulasan lalu didiamkan sampai mengering di udara (Volk dan Wheller 1988).

**11.3. Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan uji biokimia.**

Pertama uji biokimia SIM (Sulfida Indol Motility). Biakan bakteri ditanamkan pada permukaan media SIM, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}$  C. Uji sulfida, positif bila medium berwarna hitam, uji indol positif bila berbentuk warna merah setelah penambahan reagen Erlich, uji motilitas positif bila terjadi pertanaman bakteri pada seluruh media (Anonim, 2008).

Kedua uji KIA (Kliger's Iron Agar) merupakan media yang berbentuk padat, keadaan miring, warna merah, dan berfungsi untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa dan laktosa) serta sulfida. Biakan bakteri diinokulasikan pada bagian KIA yang akan diamati kemudian diinkubasi selama 24 jam selama suhu  $37^{\circ}$ C. Pengamatan dilakukan pada bagian lereng dan dasar ada tidaknya gas dan terbentuk warna hitam pada media. Pada bagian miring, jika bakteri dapat mefermentasi laktosa dan glukosa, warna media berubah menjadi kuning (Raihana 2011).

Ketiga, uji LIA (Lysin Iron Agar) merupakan media yang mengandung glukosa, asam amino lisin dan brom kresol ungu sebagai pH indikator, serta natrium tiosulfat. Metode ini bertujuan untuk identifikasi mikroba penghasil enzim yang mampu mendekarboksilasi asam amino lisin dan memproduksi gas H<sub>2</sub>S. Pengujian media LIA dilakukan pengamatan pada bagian lereng, dasar, dan adanya sulfida. Biakan bakteri diinokulasikan pada bagian media LIA yang akan diamati dengan cara inokulasi tusuk dan gores. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Diamati adanya perubahan warna merah coklat ungu, atau kuning, pada bagian lereng dan dasar media LIA. Perubahan warna hitam pada media LIA menunjukkan uji sulfida positif (Haryani 2012)

Keempat, uji Citrat. Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal, uji positif bila media berwarna biru.

## **12. Pembuatan suspensi bakteri uji**

Bakteri *Escherichia coli* dari biakan murni diambil sekitar 2 ose dan ditanam dalam tabung yang berisi medium *Brain Heart Infusion* (BHI) yang dikeruhkan dan disesuaikan dengan kekeruhan 0,5 McFarland yang dianggap setara dengan  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml bakteri *Escherichia coli*, isolat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-5 jam.

## **13. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun murbei (*Morus alba* L.) secara difusi**

Fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air yang diperoleh dari hasil ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L.) secara maserasi diuji aktivitas antibakteri dengan bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922. Metode yang digunakan adalah metode difusi.

Cara pengerjaannya metode difusi dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi yang telah dibuat dan ditekan-tekan pada ujung tabung, dioleskan pada medium MHA (*Mueller Hinton Agar*) sampai rata. Media tersebut dibuat sumuran dengan menggunakan boor prop. Sumuran untuk kontrol positif yaitu kotrimoksazol. Kontrol negatif DMSO 3% dan sumuran yang lain diisi ekstrak

uji, hasil fraksinasi *n*-heksan, etil asetat dan air dengan konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% . Masa inkubasi 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C, ada tidaknya daya hambat yang teramati dalam ukuran mm dibandingkan dengan kotrimoksazol. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar sumuran yang berisi larutan uji menandakan bahwa ekstrak serta hasil fraksi daun murbei (*Morus alba* L.) memiliki daya hambat terhadap bakteri uji (Bonang dan Koeswardono 1982). Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali.

#### **14. Pengujian aktivitas antibakteri daun murbei secara dilusi**

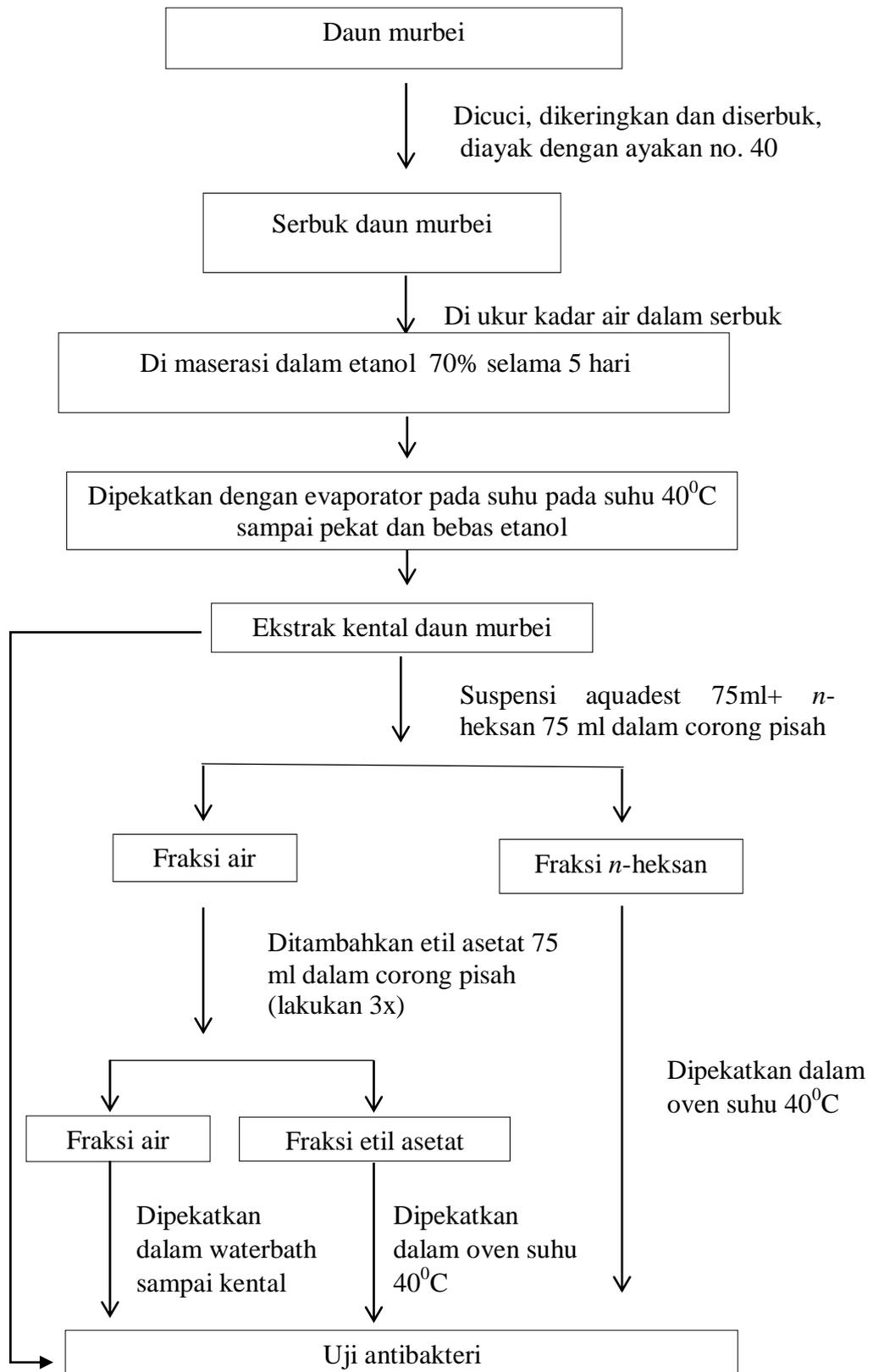
Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh dan menghambat bakteri uji. Metode dilusi menggunakan 12 tabung steril. Pembuatan larutan stok fraksi teraktif menggunakan pelarut DMSO 3%. Secara aseptis dari larutan stok tersebut dibuat deret konsentrasi yaitu kontrol - (fraksi etil asetat 50%); 50%, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,1 %, 0,09% dan kontrol + (suspensi bakteri *Eschrichia coli*) . Media BHI (*Brain Heart Infusion*) dimasukkan 0,5 ml pada tiap tabung kecuali tabung 1, tabung 2 dan tabung 12. Tabung 1 diisi dengan larutan stok hasil fraksi teraktif ( kontrol - ) 1ml, tabung 2 diisi dengan larutan stok hasil fraksi teraktif 0,5 ml ditambah dengan suspensi bakteri *Eschrichia coli* 0,5 ml, sedangkan tabung 12 diisi dengan suspensi bakteri *Eschrichia coli* 0,5 ml, kemudian pada tabung 3 dimasukkan 0,5 ml larutan stok ditambah 0,5 ml suspensi bakteri *Eschrichia coli* lalu dikocok, kemudian dari tabung 3 dipipet 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung 4 begitu seterusnya sampai tabung 11 kemudian dibuang 0,5 ml.

Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu batas terendah tabung media yang jernih atau yang memberikan hasil negatif. Kemudian menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan cara tabung media yang jernih diinokulasikan secara goresan pada media selektif untuk masing-masing bakteri uji. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Mengamati ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng.

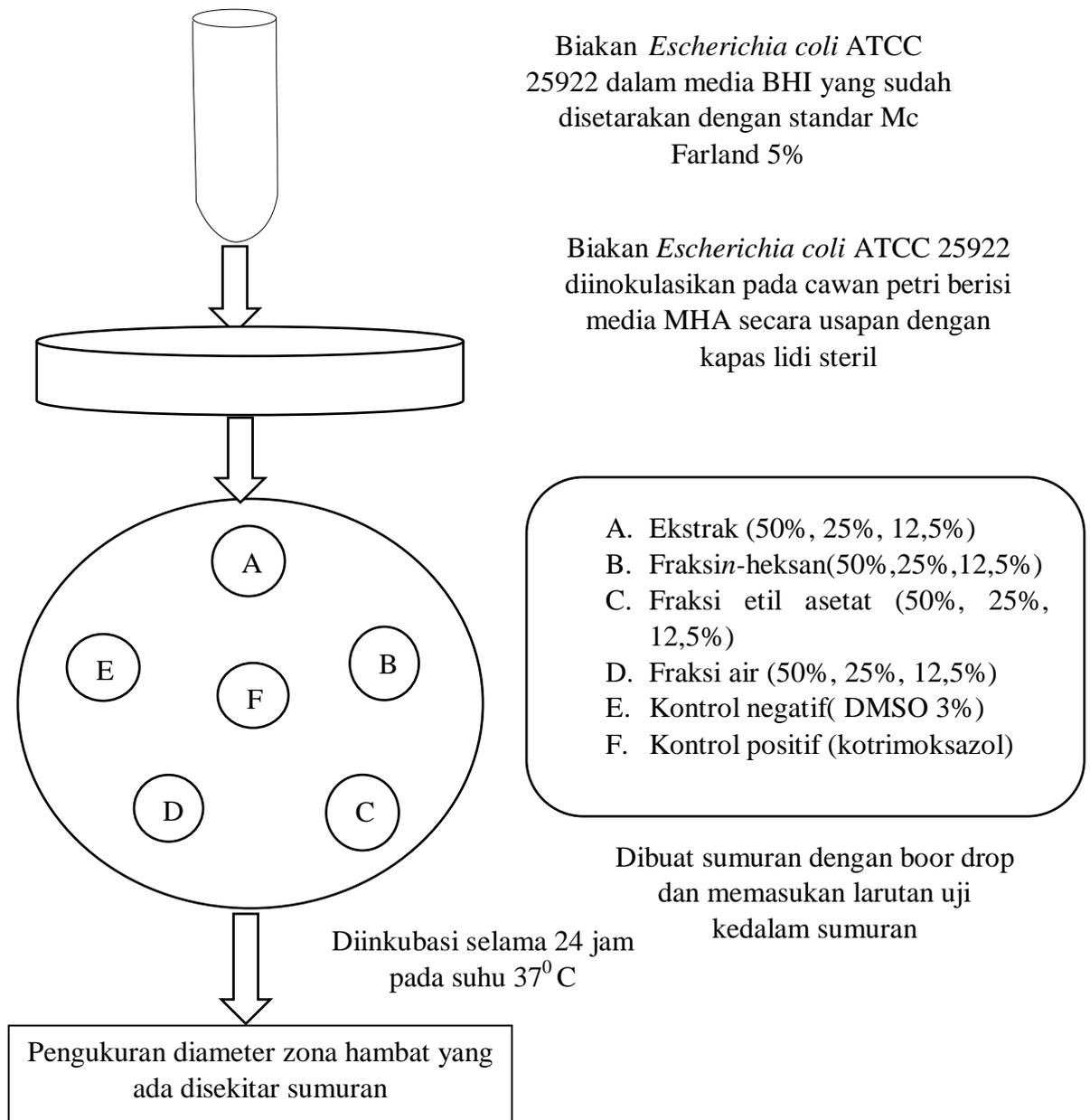
KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media *Endo Agar* yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali.

### **15. Analisis data**

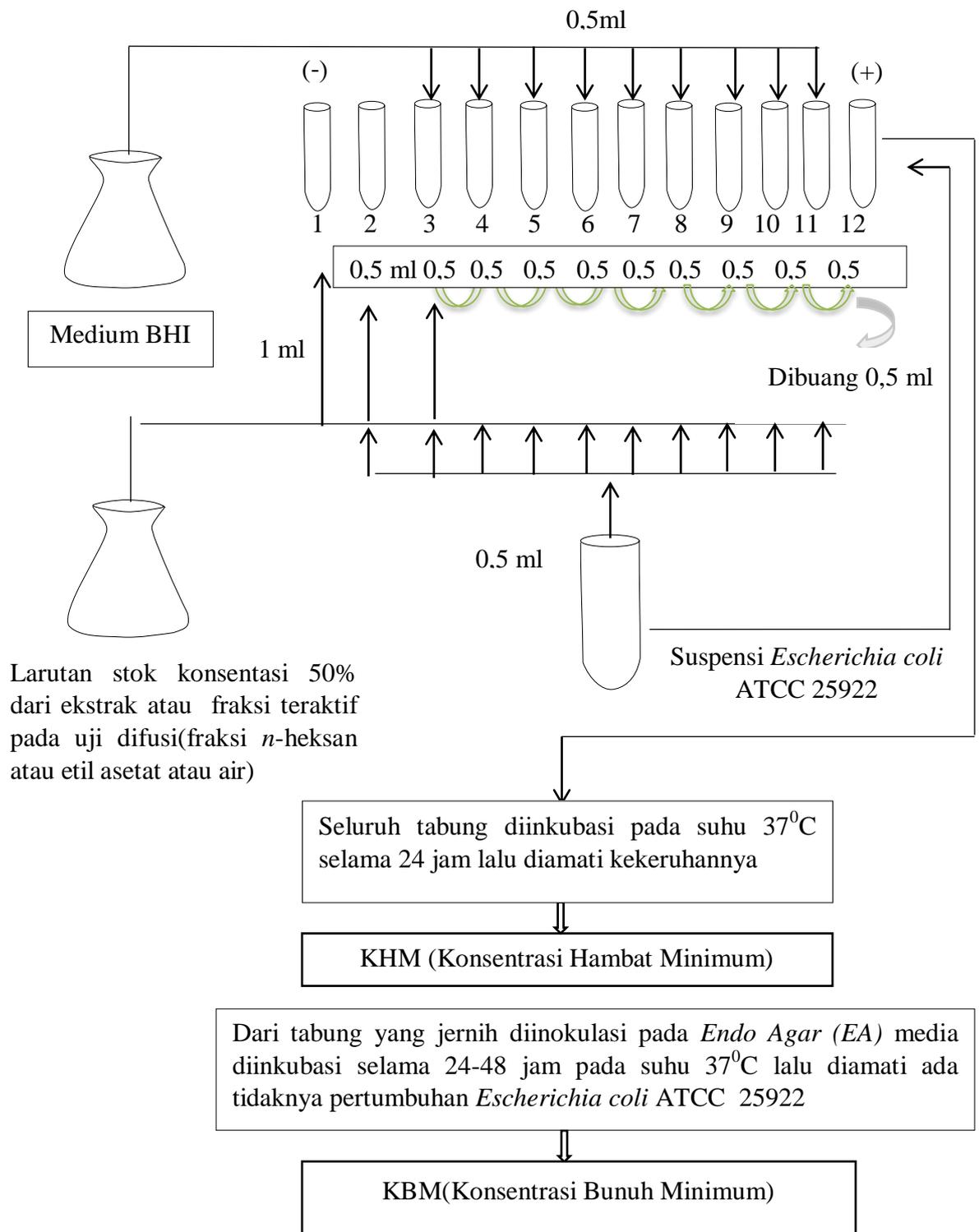
Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25 922 secara difusi dan dilusi, dan hasil fraksinasinya diuji menggunakan metode statistik yang sesuai.



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun murbei (*Morus alba* L.)



**Gambar 2.** Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak daun murbei terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi



**Gambar 3.** Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif (*n*-heksan, etil asetat dan air) dari ekstrak daun murbei terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode dilusi.

## BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

### A. Hasil Penelitian

#### 1. Determinasi tanaman daun murbei (*Morus alba* L.)

Determinasi tanaman daun murbei (*Morus alba* L.) dilakukan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi daun murbei dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran dari sampel yang diambil, untuk menghindari terjadinya kesalahan dalam mengumpulkan bahan serta kemungkinan terjadinya pecampuran bahan dengan tumbuhan yang lainnya.

Hasil determinasi daun murbei menurut Backer C.A. dan Brink R.C.B.(1965): *Flora of Java* : 1b - 2b - 3b - 4b - 12b - 13b – 14b – 17b – 18b – 19b - 20b – 21b – 22b - 23b - 24b - 25b - 26b - 27a - 799b - 800a. familia 117. Moraceae. 1b - 2b - 4b - 6b - 8b -9a -10a -11b - 12b. 2. *Morus*.1b. *Morus australis* Poir. Hasil determinasi tanaman secara lengkap dapat dilihat di lampiran 1.

#### 2. Pembuatan serbuk daun murbei

Daun murbei yang telah dikeringkan, digiling lalu diayak dengan ayak no 40 dan dihitung prosentase bobot kering terhadap bobot basah yang tercantum pada tabel 1 dibawah ini:

**Tabel 1. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun murbei**

<b>Bobot basah (gram)</b>	<b>Bobot kering (gram)</b>	<b>Rendemen % (b/v)</b>
5000 gram	3000 gram	60%

Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terdapat dalam bahan sehingga dengan pengeringan yang maksimal dapat mencegah terjadi kerusakan bahan oleh bakteri dan jamur. Bahan yang telah kering juga dapat mempermudah dalam pembuatan serbuk. Hasil rendemen bobot kering terhadap bobot basah yaitu 60%. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada lampiran 10.

### 3. Penetapan kadar lembab serbuk daun murbei

Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun murbei

Replikasi	Berat awal serbuk (gram)	Berat akhir serbuk (gram)	Kadar lembab (%)	
1	2	1,8	5	%
2	2	1,8	5	%
3	2	1,6	7	%
Rata-rata =			5,67	%

Penetapan kadar air serbuk daun murbei menggunakan *moisture balance*. Alat diatur suhu dan waktu pengeringan terlebih dahulu pada 105°C dan waktu pengeringan selama 15 menit. Neraca timbang dimasukkan pada posisi 0,00 gram. Serbuk daun murbei ditimbang sebanyak 2,0 gram, dan ditunggu sampai alat berbunyi tanda telah selesai penetapan kadar air.

Penetapan kadar lembab serbuk daun murbei bertujuan untuk mengetahui bahwa serbuk tersebut benar-benar kering. Kadar lembab serbuk daun murbei memenuhi syarat dengan nilai rata-rata 5,76 %, karena kadar lembab serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%. Kadar lembab kurang dari 10% menyebabkan sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tidak tumbuh sehingga bahan lebih awet (Katno *et al.* 2008). Jika kadar air melebihi 10% maka kemungkinan simplisia akan rusak dan ditumbuhi mikrob. Pengeringan menggunakan oven mempunyai keuntungan bahwa dengan suhu yang stabil akan menghambat pertumbuhan jamur. Perhitungan penetapan kadar air serbuk daun murbei dapat dilihat pada lampiran 11.

### 4. Pembuatan ekstrak etanol daun murbei

Serbuk daun murbei diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Keuntungan cara penyari dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Metode maserasi tidak menggunakan pemanasan sehingga komponen yang tidak tahan panas seperti flavonoid tetap ada di dalam ekstrak. Serbuk daun murbei ditimbang sebanyak 800 gram, kemudian dimasukkan dalam botol maserasi warna coklat, ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 6000 ml, dan didiamkan selama 5 hari, dengan tiga kali digojok dalam sehari. Hasil maserat disaring

dengan kain flannel, kemudian disaring lagi dengan kertas saring, kemudian dipisahkan dengan evaporator suhu 40°C. Hasil Pembuatan ekstrak etanol daun murbei dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Rendemen ekstrak daun murbei**

<b>Bobot serbuk</b>	<b>Bobot ekstrak</b>	<b>Rendemen ekstrak (%b/v)</b>
800 gram	361,59 gram	45,19%

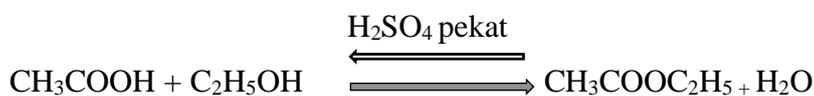
Rendemen yang diperoleh dari hasil ekstrak etanol daun murbei sebanyak 45,19%. Perhitungan hasil pembuatan ekstrak etanol daun murbei dapat dilihat pada lampiran 12

### 5. Uji bebas etanol ekstrak etanol daun murbei

**Tabel 4. Uji bebas etanol ekstrak daun murbei**

<b>Uji bebas etanol</b>	<b>Hasil uji</b>
Ekstrak etanol daun murbei + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat + CH <sub>3</sub> COOH, dipanaskan	tidak tercium bau ester yang khas

Uji bebas etanol ekstrak daun murbei dilakukan dengan cara, ekstrak etanol daun murbei ditambah asam sulfat ditambah asam asetat kemudian dipanaskan. Hasil uji tidak tercium bau ester yang khas. Reaksi yang terjadi:



Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun murbei telah bebas dari etanol 70% yaitu ditandai dengan tidak terciumnya bau ester yang khas dari etanol pada ekstrak. Tujuan dilakukan uji bebas etanol pada ekstrak daun murbei adalah untuk mencegah kesalahan pengamatan dalam tahap penelitian selanjutnya yaitu pada pengujian aktivitas anti bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, sebab etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian. Adanya pelarut etanol yang tertinggal didalam ekstrak dapat mengakibatkan bakteri terbunuh bukan oleh ekstrak, tetapi oleh sisa pelarut etanol yang tertinggal. Foto hasil uji bebas ekstrak etanol daun murbei dapat dilihat pada lampiran 4.

### 6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun murbei

Identifikasi kandungan yang terdapat dalam daun murbei bertujuan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat didalam daun murbei tersebut. Hasil

pada tabel 5 dibawah ini merupakan identifikasi kandungan kimia dari ekstrak etanol daun murbei. Senyawa yang terkandung didalam daun murbei adalah flavonoid, polifenol, alkaloid, dan terpenoid. Hasil identifikasi kandungan kimia daun murbei dapat dilihat pada tabel 5.

**Tabel 5. Identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi daun murbei**

Kandungan Kimia	Pustaka	cara kerja	Hasil dan Interpretasi data			
			Ekstrak	n-heksan	etil asetat	air
<b>Flavonoid</b>	Warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol(	ekstrak dan fraksi + 0,5 aquades dipanaskan 5 menit, disaring, filtrat +0,5mg bubuk Mg+ 1ml HCl +amil alkohol 1ml	Warna kuning Pada Lapisan Amil alkohol (+)	warna hitam (-)	warna kuning lapisan amilalkohol (+)	warna kuning lapisan amilalkohol (+)
<b>Polifenol</b>	Warna biru kehitaman atau cokelat kehitaman Robinson 1995)	0,5 g ekstrak dan fraksi+1ml air panas, disaring, filtrat+ 5ml FeCl <sup>3+</sup>	Warna Biru Kehitaman (+)	warna hitam (+)	warna biru kehitaman (+)	warna biru kehitaman (+)
<b>Alkaloid</b>	Terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dan dengan dragendroff terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam (Alamsyah et al 2014)	Ekstrak dan fraksi + larutan HCL 2N panaskan + larutan mayer dan dragendroff	Mayer; Endapan endapan Warna Putih Dragendroff: Endapan Endapan Coklat Sampai Hitam (+)	Mayer: warna kuning kecoklatan warnah coklat (+)	mayer: warna kuning dragendroff: dragendroff: dragendroff: endapan coklat sampai hitam (+)	mayer: endapan putih dragendroff coklat (+)
<b>Terpenoid</b>	Terbentuknya warna biru, hijau, merah kecoklatan atau ungu (Harbone 1987)	Ekstrak dan fraksi 0,5 g+10ml aquades dikocok 10 detik	Warna Merah Kecoklatan (+)	warna hijau (+)	warna coklat (+)	warna hitam (-)

Keterangan : (+) = ada senyawa yang diuji  
 (-) = tidak ada senyawa yang diuji

Hasil pada tabel 5 merupakan hasil identifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol dan fraksi daun murbei menggunakan tabung reaksi seperti

pada lampiran 4. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ekstrak mengandung flavonoid, alkaloid, polifenol dan terpenoid, pada fraksi *n*-heksan mengandung senyawa alkaloid dan terpenoid, pada fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, polifenol, terpenoid dan pada fraksi air mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan polifenol. Kandungan senyawa yang ada didalam ekstrak etanol maupun fraksi diperkirakan mempunyai aktivitas sebagai antibakteri.

## **7. Hasil fraksi ekstrak etanol daun murbei**

Fraksinasi adalah proses pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolarannya dalam suatu tumbuhan. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (Tiwari *et al.*, 2011). Bahan aktif yang sudah terekstraksi dalam masing-masing pelarut yang sesuai dengan kepolarannya akan mudah diperkirakan kandungan kimia yang dapat digunakan sebagai antibakteri (Mukhrani 2014; Tiwari *et al.* 2011).

Hasil ekstrak yang didapatkan dari maserasi difraksi dengan 3 pelarut yang memiliki sifat kepolaran yang berbeda-beda. Pelarut nonpolar yaitu *n*-heksan, pelarut semi polar adalah etil asetat, dan air adalah sebagai pelarut polar yang kemudian dilakukan fraksinasi.

**7.1 Hasil fraksi *n*- heksan.** Hasil ekstrak maserasi yang telah didapatkan ditimbang kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut nonpolar (*n*-heksan), difraksinasi 3 kali dengan pelarut *n*-heksan masing-masing 75 ml, kemudian fraksi *n*-heksan yang didapat diuapkan dengan oven pada suhu 40°C. Residu yang didapat dilakukan ekstraksi lanjutan dengan pelarut etil asetat. Organoleptis fraksi *n*-heksan berwarna kehijauan, konsistensi kental, tidak berbau. Hasil rendemen prosentase fraksi *n*-heksan daun murbei dapat dilihat pada tabel 6

Berdasarkan hasil perhitungan diatas prosentase rata-rata rendemen fraksi *n*-heksan daun murbei adalah 7,9%. Hasil perhitungan prosentase rendemen fraksi *n*-heksan dapat dilihat pada lampiran 13.

**7.2 Hasil fraksi etil asetat.** Residu dari *n*-heksana dilanjutkan dengan fraksinasi dengan pelarut semipolar (etil asetat). Residu dari fraksinasi *n*-heksan

difraksi 3 kali dengan pelarut etil asetat masing-masing 75 ml. Fraksi yang didapat dipekatkan dalam oven 40°C. Organoleptis fraksi etil asetat warna hitam kehijauan, konsistensi kental, tidak berbau. Berdasarkan hasil perhitungan pada tabel 6 prosentase rata-rata rendemen fraksi etil asetat daun murbei yaitu 13,2%.

Hasil perhitungan prosentase rendemen fraksi etil asetat daun murbei dapat dilihat pada lampiran 13.

**7.3 Hasil fraksi air.** Residu hasil fraksinasi etil asetat dilanjutkan dengan pemekatan dengan waterbath pada suhu 40°C sehingga didapat ekstrak kental. Organoleptis fraksi air warna hitam konsistensi kental, tidak berbau. Hasil prosentase rendemen fraksi air daun murbei dapat dilihat pada tabel 6

Berdasarkan hasil perhitungan diatas didapatkan prosentase rata-rata rendemen fraksi air daun murbei yaitu 52,7%. Hasil perhitungan prosentase rendemen fraksi air daun murbei dapat dilihat pada lampiran 13.

**Tabel 6. Rendemen hasil fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan fraksi air daun murbei**

Fraksi	Bobot Ekstrak (G)	Bobot Fraksi (G)	Rendemen (%)
<i>n</i> -heksan	10,01	0,84	8,4 %
Etil asetat		1,32	13,2 %
Air		5,22	52,2 %
<i>n</i> -heksan	10,01	0,78	7,8 %
Etil asetat		1,35	13,5 %
Air		5,31	53,1 %
<i>n</i> -heksan	10,02	0,75	7,5 %
Etil asetat		1,29	12,9 %
Air		5,30	53,0 %

## 8. Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

**8.1 Hasil isolasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 .** Isolasi bakteri *Escherichia coli* pada media *Endo Agar* (EA) dalam cawan petri menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya warna koloni merah kilap logam. Hal ini disebabkan karena bakteri *Escherichia coli* dapat memfermentasi laktosa sehingga

menyebabkan warna medium *Endo Agar* disekitar koloni berwarna merah kilap logam (Volk dan Wheller 1988). *Escherichia coli* memfermentasi laktosa akan menghasilkan asam dan aldehid, dengan bantuan oksidasi dari udara akan memecah ikatan fuchsin dan sulfat yang ada dimedium, akibatnya fuchsin membentuk kilap logam dan medium menjadi merah. Hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 5.

**8.2 Hasil identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 tersebut termasuk golongan Gram negatif atau positif. Bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 diperoleh hasil dengan sel bakteri berwarna merah, bentuk batang. Kristal ungu (Gram A) ditetaskan sehingga menyebabkan kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. Mordant (lugol iodine/Gram B) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya ikatan dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas peningkatan zat warna oleh sel bakteri, seluruh bakteri akan berwarna biru. Gram C (alkohol) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya pori-pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks kristal ungu-iodine tidak menempel pada dinding sel bakteri, hal ini menyebabkan sel Gram negatif akan kehilangan warna birunya. Pewarna safranin (Gram D) ditetaskan sehingga sel Gram negatif yang awalnya kehilangan warna akan memiliki warna yang kontras yaitu merah. Hasil identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pengecatan Gram dapat dilihat pada lampiran 5

**8.3 Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan uji biokimia.** Uji biokimia bakteri merupakan suatu cara untuk mengidentifikasi suatu biakan bakteri murni yang ditanam pada media uji berdasarkan sifat-sifat fisiologinya. Identifikasi uji biokimia pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menggunakan medium yang terdiri dari, *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Kliger's Iron Agar* (KIA), *Lysin Iron Agar* (LIA), dan citrate.

**Tabel 7. Identifikasi uji biokimia pada *Escherichia coli* ATCC 25922**

Pengujian	Hasil	Pustaka
SIM	+++	+++
KIA	A/AG S(-)	A/AGS(-)
LIA	K/K S(-)	K/K S(-)
CITRAT	-	-

Keterangan:

SIM	: Sulfida Indol Motilitas	-	: Reaksi Negatif
KIA	: Kliger Iron Agar		
LIA	: Lysine Iron Agar	+	: Reaksi Positif
A	: Kuning		
K	: Merah atau ungu		
G	: Terbentuk gas		
S	: Terbentuk Sulfida (warna hitam)		

Medium *Sulfida Indol Motilitas* (SIM) bermanfaat untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan adanya motilitas. Pengujian SIM menunjukkan hasil sulfida negatif ditandai dengan tidak terbentuk warna hitam pada medium, artinya *Escherichia coli* tidak dapat mereduksi thiosulfate, sehingga menghasilkan hidrogen sulfida. Uji indol positif setelah ditambahkan tiga tetes reagen Erlich A dan B. Reagen Erlich A dan B mengandung dimetilaminobenzaldehid dan akan menghasilkan cincin merah pada permukaan media karena indol akan bereaksi dengan dimetilaminobenzaldehid sehingga membentuk rosindol yang berwarna merah. Uji indol positif disebabkan bakteri *Escherichia coli* membentuk indol dari tryptopan sebagai sumber karbon Uji motilitas diperoleh hasil positif, ditunjukkan dengan adanya penyebaran pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada media SIM.

Medium *Kliger Iron Agar* (KIA) untuk mengetahui apakah bakteri dapat melakukan fermentasi karbohidrat terutama dalam bentuk gula. misalnya: glukosa, laktosa, ada tidaknya gas, dan pembentukan sulfida. Gula jika diurai maka akan menghasilkan asam atau menghasilkan asam atau basa. Pengujian dengan media KIA setelah diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam hasil menunjukkan A/A(S) Hasil A/A artinya pada lereng dan dasar media berwarna kuning dari warna dasar merah, yang menunjukkan bahwa bakteri mampu memfermentasi glukosa dan laktosa. Hasil S- artinya H<sub>2</sub>S negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada medium KIA, karena bakteri tidak

mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H<sub>2</sub>S, endapan hitam ini terbentuk dari hydrogen sulfida (H<sub>2</sub> S ) yang akan bereaksi Fe<sup>++</sup>. Hidrogen sulfida terbentuk karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan methion.

Medium KIA mengandung laktosa, glukosa dan phenol red sebagai indikator. Indikator phenol red adalah senyawa yang tidak bereaksi bisa menyebabkan pH basa akan berwarna merah, dan pH asam menyebabkan warna kuning. Laktosa yang difermentasi oleh bakteri akan menyebabkan pH turun dan terjadinya warna kuning dibagian bawah tabung, karena jumlah laktosa lebih banyak.

Medium *Lysin Iron Agar* (LIA) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Pengujian media LIA setelah diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C menunjukkan hasil K/K S-. Hasil K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, ini berarti bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) di seluruh media, karena warna pembenihan ini mengandung bromheksol ungu dari warna coklat menjadi warna ungu. Hasil S(-) artinya uji H<sub>2</sub>S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media *Lysin Iron Agar* (LIA).

Medium Citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrate sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian citrat hasilnya negatif ditandai dengan medium hijau, berarti bakteri *Escherichia coli* tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Medium Citrat terdapat indicator *Bromo Thymol Blue* (BTB) yang merupakan indikator pH. Jika mikroba mampu menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal menyebabkan suasana basa sehingga terjadinya peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. Hasil uji identifikasi bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada lampiran 5.

## **9. Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli***

Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah sel bakteri. Hasil pembuatan suspensi bakteri telah setara dengan

perbandingan standar Mc Farland 0,5. Jika suspensi terlalu keruh maka diencerkan dengan penambahan media *Brain Heart Infusion* (BHI). Jika terlalu encer atau jernih maka ditambahkan suspensi bakteri sampai setara dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5. Hasil pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada lampiran 5.

#### **10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun murbei (*Morus alba* L.) secara difusi.**

Metode difusi mempunyai keuntungan yaitu untuk mengetahui senyawa yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Kelemahan dari metode difusi adalah tidak bisa mengetahui pada kadar berapa membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri

Hasil dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun murbei diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi. Konsentrasi yang digunakan yaitu 50%, 25%, 12,5% dari masing-masing ekstrak dan fraksi. Kontrol positif menggunakan kotrimoksazol dan kontrol negatif menggunakan DMSO 3%.

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi bertujuan untuk mengetahui daya hambat dari larutan uji terhadap pertumbuhan biakkan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Tujuan metode difusi untuk mengetahui dari fraksi yang digunakan yang mempunyai aktivitas antibakteri paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Uji secara difusi dilakukan menggunakan *boor prop*, masing-masing lubang diisi dengan larutan uji( ekstrak etanol daun murbei, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, kontrol positif kotrimoksazol, dan kontrol negatif DMSO 3%) dengan waktu inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37<sup>0</sup>C. Aktivitas antibakteri dari larutan uji dapat diketahui dengan ada atau tidaknya daerah hambat yang terbentuk lalu diukur dan dibandingkan dengan kontrol positif yaitu kotrimoksazol. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menunjukkan adanya daya

hambat, ini dibuktikan dengan adanya daerah jernih disekitar sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri.

**Tabel 8. Hasil uji aktivitas antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 metode difusi**

Konsentrasi	Sampel	Diameter Hambat (mm)			
		Replikasi			
		1	2	3	Rata-rata $\pm$ SD
50%	Ekstrak etanol	15	14	11	13,33 $\pm$ 2,082
	<i>n</i> -Heksan	18	18	13	16,33 $\pm$ 2,887
	Etil asetat	23	23	22	22,67 $\pm$ 0,577
	Air	10	10	8	9,33 $\pm$ 1,155
25%	Ekstrak etanol	12	12	9	11,00 $\pm$ 1,732
	<i>n</i> -Heksan	9	9	12	10,00 $\pm$ 1,732
	Etil asetat	20	19	18	19,00 $\pm$ 1,000
	Air	5	5	5	5,00 $\pm$ 0,000
12,5%	Ekstrak etanol	11	11	8	10,00 $\pm$ 1,732
	<i>n</i> -Heksan	7	7	6	6,67 $\pm$ 0,577
	Etil asetat	18	18	17	17,67 $\pm$ 0,577
	Air	4	4	4	4,00 $\pm$ 0,000
Kontrol (+) Kotrimoksazol		35	35	35	35 $\pm$ 0,000
Kontrol (-)		-	-	-	-

Fraksi dan ekstrak pada konsentrasi 50% memiliki diameter daerah hambat yang lebih besar dari pada konsentrasi 25% dan 12,5%. Berdasarkan tabel 8 hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922 dibandingkan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan dan fraksi air daun murbei. Hasil rata-rata diameter daerah hambat fraksi etil asetat dengan masing-masing konsentrasi yaitu 50%, 25% dan 12,5% adalah 22,67 mm, 19 mm, dan 17,67 mm. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 8.

Kontrol positif (Kotrimoksazol) terbukti efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan diameter zona hambat paling besar dengan rata-rata yaitu 35 mm dibandingkan dengan fraksi teraktif (etil asetat) yaitu 22,67mm. Penguji aktivitas antibakteri secara difusi menggunakan kontrol negatif DMSO 3 % yang dalam penguji ini tidak aktif dalam menghambat bakteri uji. Perhitungan standar deviasi berfungsi untuk mengetahui besar perbedaan dari nilai sampel terhadap rata-rata dari jumlah keseluruhan obyek yang diamati.

Standar deviasi juga menyatakan besarnya keragaman sampel. Suatu nilai deviasi yang lebih besar, maka akan memberikan arti bahwa titik dan individu jauh dari nilai rata-rata ( tabel 8) nilai standar deviasi termasuk baik, karena nilainya termasuk rendah.

Analisis data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi menggunakan statistik Analisis of Varian (ANOVA) *one way*. ANOVA *one way* digunakan untuk membandingkan sampel pada tiap konsentrasi. Data yang dianalisis dengan ANOVA *one way* adalah konsentrasi 50%, 25%, 12,5% dari fraksi *n*-heksan, etil asetat, air, dan ekstrak etanol daun murbei. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara fraksi *n*-heksan, etil asetat, air, ekstrak etanol, guna mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji *One-Sampel Kolmogorove-Sminov* diperoleh signifikan  $0,886 > 0,05$  maka  $H_0$  diterima, data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji ANOVA. Hasil uji *oneway* ANOVA tabel diameter hambat diperoleh  $F = 111,500$  dengan probabilitas  $0,000 < 0,05$  yang berarti dari tiap sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *Escherichia coli* ATCC 25922. Berdasarkan tabel Tukey dan Bonferroni test terdapat tanda \* pada *Mean Difference*, tanda tersebut menunjukkan bahwa perbedaan diameter hambat aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Apabila tidak terdapat tanda \* maka diameter hambat aktivitas antibakteri tidak signifikan artinya tidak memiliki perbedaan. Hasil analisis Tukey test dan Bonferroni test dapat dilihat pada lampiran 18

Tabel *Homogeneous Subsets* bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* terbagi dalam 7 subset semakin arah kekanan semakin besar diameter hambatnya. Subset 1 terdapat fraksi air 12,5% 4,00, fraksi air 25% 5,00, fraksi *n*-heksan 12,5% 6,67. Subset 2 terdapat fraksi *n*-heksan 12,5% 6,67, fraksi air 50% 9,33, fraksi *n*-heksan 25% 10,00, ekstrak etanol 12,5% 10,00 Subset 3. fraksi air 50% 9,33, fraksi *n*-heksan 25% 10,00, ekstrak etanol 12,5% 10,00, ekstrak etanol 25% 11,00, ekstrak etanol 50% 13,33. Subset 4 terdapat

ekstrak etanol 50% 13,3 fraksi *n*-heksan 50% 16,33 . Subset 5 terdapat fraksi *n*-heksan 50% 16,33, fraksi etil asetat 25% 17,67, fraksi etil asetat 50% 19,00. Subset 6 terdapat fraksi etil asetat 25% 19,00, fraksi etil asetat 50% 22,67. Subset 7 terdapat kontrol + 35,00. Diameter daerah hambat dari subset 1-7 diketahui mempunyai perbedaan yang nyata dalam menghambat aktivitas bakteri. Fraksi teraktif adalah etil asetat. Tabel *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada lampiran 18.

Berdasarkan tabel 8 dan analisis data dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dilihat dari besarnya diameter hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 yaitu 22,67mm, dibandingkan ekstrak etanol daun murbei, fraksi *n*-heksan dan air. Sifat etil asetat yang semi polar ini menyebabkan fraksi mengandung metabolit sekunder yang lebih kompleks dibandingkan pada fraksi polar dan non polar, oleh sebab itu fraksi etil asetat lebih banyak menarik senyawa yang bersifat sebagai antibakteri yakni flavonoid, alkaloid dan polifenol, hal tersebut mengakibatkan fraksi etil asetat menjadi fraksi teraktif dengan membentuk daerah hambat yang paling besar serta fraksi yang teraktif dibandingkan fraksi *n*-heksan dan fraksi air.

Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Mekanisme kerja flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri. Mekanisme kerjanya dengan cara mendenaturasikan protein sel bakteri dan merusak membrane sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Juliantina 2008).

Senyawa flavonoid juga mempunyai mekanisme kerja sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat dari sel bakteri, menghambat fungsi dari membran sitoplasma, dan flavonoid juga dapat mengganggu metabolisme energi yang dibutuhkan oleh bakteri sehingga pertumbuhan bakteri terhambat (Chusnie & Lamb 2005).

Alkaloid memiliki mekanisme penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Juliantina 2008).

Polifenol memiliki mekanisme sebagai antibakteri dengan mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga permeabilitas dinding sel bakteri dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim (Juliantina 2008)

Penggunaan antibiotik kotrimoksazol sebagai kontrol positif masih lebih efektif digunakan dimasyarakat dibandingkan hasil fraksi daun murbei (*Morus alba* L.) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

### **11. Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun murbei (*Morus alba* L.) secara dilusi**

Hasil fraksinasi ekstrak etanol yaitu fraksi yang paling aktif dari daun murbei (*Morus alba* L.) dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 menggunakan metode dilusi untuk mengetahui KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) yaitu konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Kemudian menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan cara tabung yang jernih diinokulasikan secara goresan pada media selektif yaitu *Endo Agar* (EA) untuk masing-masing bakteri uji. Pengujian aktivitas fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun murbei dilakukan terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan konsentrasi larutan masing-masing 50%, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,12%, 1.56%, 0,78%, 0,39%, 0,19 %, 0,09%. kontrol (+) dan kontrol (-).

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) sulit diamati karena fraksi uji yang berwarna sehingga sulit dibedakan antara keruh dan jernih, sehingga perlu dilakukan goresan pada media selektif yaitu *Endo Agar* (EA). Media *Endo Agar*(EA) digunakan untuk mengisolasi bakteri gram negatif berdasarkan kemampuan memfermentasi laktosa atau tidak. Tujuannya supaya terlihat Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada fraksi yang diuji. Metode dilusi bermanfaat untuk mengetahui dosis minimal dari fraksi yang bersifat antibakteri. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan menginokulasi sediaan dari tabung uji pada media *Endo Agar* (EA) dalam cawan petri steril. Konsentrasi bunuh minimum ditentukan pada medium *Endo Agar* (EA) dengan konsentrasi minimum yang tidak menunjukkan pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Tabel 9. Hasil aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak daun murbei terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922**

Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat 50%		
	I	II	III
kontrol (+)	+	+	+
50%	-	-	-
25%	-	-	-
12,5%	-	-	-
6,25%	-	-	-
3,12%	-	-	-
1.56%	+	+	+
0,78%	+	+	+
0,39%	+	+	+
0,1 %	+	+	+
0,09 %	+	+	+
kontrol (-)	-	-	-

Keterangan  
 (+): ada pertumbuhan bakteri  
 (-) : tidak ada pertumbuhan bakteri  
 Kontrol (-): fraksi etil  
 Kontrol (+) : suspensi bakteri

Berdasarkan tabel 9 diatas hasil dari penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat konsentrasi 50% dapat membunuh pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan Konsentrasi Bunuh Minimum 3,12%. Foto hasil uji dilusi fraksi teraktif ( etil asetat 50%) dapat dilihat pada lampiran 9.

Fraksi etil asetat konsentrasi 50% adalah fraksi yang paling aktif. Hasil tersebut disebabkan oleh adanya kandungan senyawa semipolar di fraksi etil asetat yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Senyawa yang efektif dari fraksi etil asetat daun murbei yang menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah flavonoid, alkaloid dan polifenol.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun murbei (*Morus alba* L.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dapat disimpulkan bahwa

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dari daun murbei (*Morus alba* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, fraksi yang paling aktif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah fraksi etil asetat, pada konsentrasi 50% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 22,67 mm

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 sebesar 3,12 %

#### **B. Saran**

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut daun murbei (*Morus alba* L.) sebagai antibakteri pada bakteri Gram negatif yang lain selain *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air daun murbei (*Morus alba* L.) secara *in vivo*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah A. 2004. Sensitivitas Salmonella Typhimurium terhadap ekstrak daun *psidium guajava L.* *Jurnal FKIP Universitas Lampung* .mangkurat.bioscientiae1 halaman (31-38).
- Alamsyah HK, Widowati I, Sabdono A. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *Sargassum cinereum* (J.G. Agardh) dari perairan pulau panjang jepara terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermidis*. *Journal Of Marine Research* 3:69-78.
- Albuquerque A. J. R., Silva, P. M. F., Cavalcante, A. L. F. A. and Sampaio, F.C. 2013. *Polyphenols as A Source of Antimicrobial Agents against Human Pathogens*. ISBN: 978- 1-62417-534-3. Brazil: Nova Science Publisher Inc.
- Anita, A., Khotimah, S. dan Yanti, A. H. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Benalu Jambu Air (*Dendrophoe pentandra* (L.) Miq) terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi*. *Jurnal Protobiont*. 3 (2) : 268-272.
- Anonim. 2008. Identifikasi *Escherichia coli* . <http://www.plantamor.com>. 1:48 12/12/2012
- Arifianti L, Oktarina RD, Kusumawati I. 2014. Pengaruh jenis pelarut pengekraksi terhadap kadar sinensetin dalam ekstrak daun *Orthosiphon stamineus* benth. *E-Journal Planta Husada* 2:1-4.
- Arisandi L.J. 2016 .*Uji aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol, Fraksi n- Heksan, Etil Asetat dan Air dari Daun Talas (Colocasia esculente (L) Schott) terhadap Escherichia coli*. [Skripsi]. Surakarta; Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Arisman. 2009. *Keracunan Makanan: Buku Ajar Ilmu Gizi*. Jakarta : EGC
- Atmosoedarjo, S., J. Kaomini, W. Kartasubrata, M. Saleh, W. Moerdoko, Pramodibyo dan S. Roeprawiri. 2000. *Sutera Alam Indonesia*. Yayasan Saran Jaya, Jakarta.
- Azis,S. 2010. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun dan Umbi Bakung Putih (Gracillaria verrucosa) terhadap bakteri patogen gram negatif* [Skripsi].Program Studi Farmasi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan.UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Bakung CT. 2014. *Studi Penggunaan Antibiotik Pada Pasien ISPA Rawat Jalan Di Rumah Sakit Professor dr Aloe Saboe Kota Gorontalo* [Thesis].Universitas Negeri Gorontalo.
- BonangG dan Koeswardono.1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboraturium danKlinik*. Jakarta: PT Gramedia.

- Cahyono R. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi *n*-Heksan, Etil Asetat, dan Air Dari Ekstrak Bunga Biduri (*Calotropis gigantean* (L.) Dryand) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 secara in vitro [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Setia Budi Surakarta.
- Chandra, S. & Rakholiya, K., 2011, Combination therapy Synergism Between Natural Plant Extract and Antibiotics Against Infection Diseases, *Science agant microbial pathogens*, 360 (5), 520-529.
- Cushnie, T. P. & Lamb, A. J., 2005, Antimicrobial aktiviti of Flavonoids *International Jurnal of Animicrobial Agents*, 26, 343-356.
- Dalimartha S. 2000. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Jilid I*. Jakarta: Trubus Agriwidya; hal 214
- Dalimartha S. 2008. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Jilid II*. Jakarta: Trubus Agriwidya; 2001. 90-2.
- Darmandi. 2008. Infeksi Nosokomial : Problematika dan Pengendaliannya. Jakarta:Salemba Medika .hal.80-81.
- Depkes RI, 2000. *Acuan Sediaan Herbal* .Jakarta:Diktorat Jendral POM Depkes RI.
- Direja HE. 2007. *Kajian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Jintan Hitam (Nigella sativaL) Terhadap Bakteri Patogen dan Perusak Pangan* [Skripsi]. Bogor: Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas teknologi Pertanian, Institut Pertaian Bogor.
- Food and Agriculture Organization (FOA). 2002. *Mulberri for Animal Production*, Roma
- Ganiswara. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Ed ke-5. Jakarta: Gaya Baru. Hlm. 585-598.
- Gunawan, D. dan Mulyani, S. 2004. *Ilmu Obat Alami ( Farmakognosi )*. Jilid 1. Bogor: Penerbit Swadaya
- Gunawan SG, Setiabudy R, Nafrialdi, Elysabeth, editor. 2009. *Farmakologi dan Terapi*. Ed ke 5. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI. hlm 585-587, 605-608.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun dan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Kosasih P, Iwang S, penerjemah; Sofia N, editor. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.
- Hariana, A. 2008. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya Seri 2*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Haryani Y, Chainulfiffah, Rustiana, 2012. Fermentasi Karbohidrat oleh Isolate *Salmonella spp.*dari Jajanan Pinggir Jalan. *Jurnal Indonesia che.Acta* 3:23-25.

- Hastuti, U.S., Oktantia, A., dan Khasanah, H.N. 2012. *Daya Antibakteri Daun dan Buah Murbei (Morus alba L.) terhadap Staphylococcus aureus dan Shigella dysenteriae.*[ Skripsi]. Malang : Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang
- Jawetz E, JL Melnick, EA Adelberg, EA .1986. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan*. Edisi 16, Jakarta :Buku kedokteran. Hlm 299-301.
- Jawetz Melnick, dan Adelbergs. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Surabaya: Salemba Medika. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
- Jawetz E, JL Melnick, EA Adelberg, EA. 2005. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*, Diterjemakan oleh Bonang G. Edisi XXIV, ECG., Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Juliantina, F. R. 2008. Sebagai Agen Anti Bakteri Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *JKK-Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*.
- Jurian V. Yosavin 2016. *Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak daun Murbei (Morus alba L.) Terhadap Escherichia coli*. [Skripsi]. Jember; Teknologi Pertanian Universitas Jeber
- Kementerian Kesehatan RI. 2014. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
- Kairupan PC, Fatimawali , Widya AL. 2014. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Kembang Sepatu (hibiscus rosa- sinesis L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Eschericia Coli. *Pharmacon jurnal ilmiah farmasi* 3:93-98
- Lenny, S. 2006. Senyawa Terpenoid dan Steroid. Medan: Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara. *jurnal ilmiah* .Hlm 14
- List P.H.,P.C.Schmidt. 2000. *Phytopharmaceuticals Technology*. ahli bahasa David Ellaby. Florida: CRS Press.hal 67, 71, 73, 107-111.
- Maharani E.T.W; Mukaromah A.H; Farab M.F. 2014. Uji Fitokimia eksrak daun Sukun kering (*artocarpud altilis*). *jurnal unimus*.edisi 11
- Martin, E. A. 2012. *Kamus Sains*. Alih bahasa oleh Ahmad Lintang Lazuardi. Jakarta: Pustaka Pelajar
- Musawwir. 2014. *Daya Hambat Antibakteri Daun Murbei (Morus alba L.) dan Penggunaannya Sebagai Konsentrat terhadap Performa Ayam Buras Petelur*. [Skripsi]. Makassar : Fakultas Peternakan Universitas Hasanudin
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan* 7:361-367.

- Nurmala, Virgiandhy IGN, Andriani, Delima FL. Resistensi dan sensitivitas bakteri terhadap antibiotik di RSUD dr. Soedarso Pontianak tahun 2011-2013. *EJKI*. 2015;3(1):21-8.
- Octavia D.R. 2009. *Uji aktivitas penangkap radikal ekstrak petroleumeter,etil asetat dan Daun Binahong (anredera cordi folia (tonore) steen) dengan metode DPPH (2,2-difrnil-1-pikrihidrazl) [skripsi]*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah
- Permadi, A. 2006. *Tanaman Obat Pelancar Air Seni*. Jakarta: Penerbit Swadaya
- Praduyudani, M. F., Utami,S.R dan Endang,S. 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Sawo Kecik (*manilkara kauki l.dubard*) terhadap bakteri *E. coli*. [*Jurnal*] *SMK Negeri 1 Pasuruan dan Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang*.
- Purwanto, R. 2008. *Peranan Mikroorganisme Endofit sebagai Penghasil Antibiotik*.
- Purwatresna, E. 2012. *Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Air Dan Etanol Daun sirsak Secara In Vitro Melalui Inhibisi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase*. Bogor: IPB
- Radji M. 2002. *Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Radji, M. 2011. *Mikrobiologi. Buku Kedokteran ECG*, Jakarta halaman 112-120
- Raihana N . 2011. *Profil kultur dan uji sensitivitas bakteri aerob dari infeksi luka operasi liparatomi di bangsal bedah RSUP dr. Djamil Padang [Artikel]*.Padang: Universitas Andalas Padang
- Rao, K. V..(2008) *Journal of Natural Products*, 67, 1314-1318.
- Redha A. 2010. Flavonoid: struktur sifat antioksidatif dan peranannya dalam sisteem biologi. *Jurnal berlian* 9: halaman 196-202
- Robinson T,1995.*kandungan organik tumbuhan tingkat tinggi*, diterjemahkan oleh Padwaminta.Bandung:penerbit ITB. *journal of Biological , Chemical ,and pharmaceutical Sciences*. 2014 :2 (1);1-7.
- Romas A, Devi, U.R, Mohamad, A. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Manggis (*garcinia mangostana l*) terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 11229 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 secara in vitro. *Jurnal* . Surakarta Fakultas Kedokteran Muhammadiyah
- Siswandono dan Soekardjo B.2008. *Kimia Medisinal*. Airlangga University Press.Halaman:128
- Sulastrianah, Imran, Eka Suci Fitria.2014.Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) Dan Daun Sirih (*Piper betle L.*) Terhadap

- Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. [Artikel]. Sulawesi Tenggara  
Kakultas Kedokteran Universitas Halu Oleo hal 79-82
- Sunanto, H. 2009. *100 Resep Sembuhkan Hipertensi, Obesitas dan Asam Urat*.  
Jakarta :PT. Gramedia.
- Suriawiria, U. 1986, *Pengantar Mikrobiologi Umum*, Penerbit Angkasa,  
Bandung. Suryono, B., 1995. *Bakteriologi Umum dan Bakteriologi Klinik*.  
Akademi Analis Kesehatan Bhakti Wijaya Kediri. Hlm 18, 45-50
- Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta :Gramedia. hlm 42-44.
- Susanti A.D. 2012. Polaritas pelarut sebagai pertimbangan dalam pemilihan  
pelarut untuk ekstraksi minyak bekatul dari bekatul varietas ketan (*oriza  
sativa glatinosa simposium*. jurnal nasional rapi 1X FT.
- Tee Vincent. 2007. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus alba L.*)  
Terhadap Durasi Penyembuhan Luka Pada Mencit. *Jurnal Ilmiah  
Kedokteran* 2:1-16. Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha.
- Tiwari P., Bimlesh K., Mandeep K., Gurpreet K., Harleen K. 2011. *Skrining  
Fitokimia dan Ekstraksi*. Internationale Pharmaceutica Scientia Jan-Maret  
2011: Vol 1 Issue 1. Departemen Farmasi Ilmu Sekolah, Indah Ilmu  
Farmasi. Phagwara, Punjab.
- Tjay TH dan Rahardja K. 2002. *Obat-obat Penting*. Edisi I. Jakarta: Depkes. hlm  
195-203.
- Voigt R., (1994). *Buku pelajaran teknologi farmasi*, diterjemahkan oleh Soendani  
Noerono Soewandhi, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. pp.516.
- Volk, W.A. dan heeler, MF., 1988, *Mikrobiologi Dasar* : Penerbit Erlangga.  
Jakart. Hlm 331-335
- Volk, W.A. dan Wheeler, MF., 1990, *Mikrobiologi Dasar*, Penerbit Erlangga,  
Jakarta, hal 97-98.
- Waluyo L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang:UMM Pres.hal 41-47.
- Widyarto A. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Keprok (*Citrus  
nobilis Lour*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*  
[Skripsi]. Surakarta. Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah.
- World Health Organization (WHO). 2005. Penyakit Bawaan Makanan: Fokus  
Pendidikan Kesehatan. Alih bahasa oleh Andry Hartono. Jakarta : EGC.

L

A

M

P

I

R

A

N



**Lampiran 2. Foto daun murbei dan serbuk daun murbei**Daun Murbei (*Morus alba* L.)

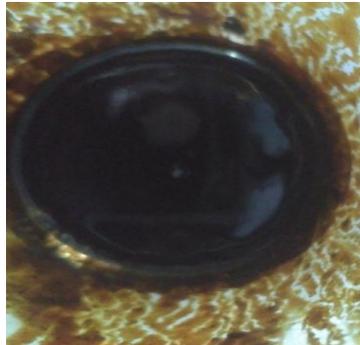
Serbuk daun murbei

**Lampiran 3. Foto ekstrak daun murbei, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air**

Ekstrak daun murbei

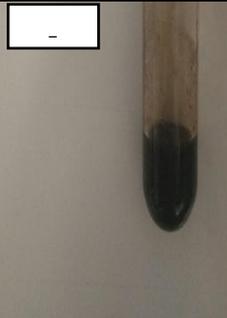
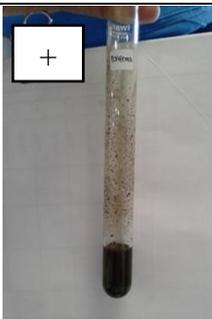
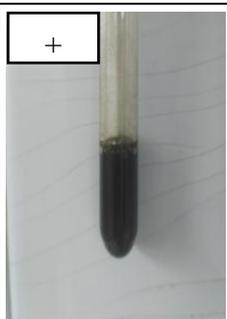
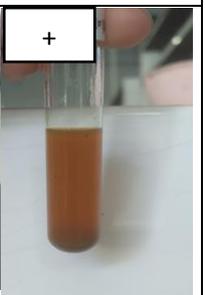
Fraksi *n*-heksan daun murbei

Fraksi etil asetat daun murbei



Fraksi air daun murbei

**Lampiran 4. Foto identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi daun murbei**

Senyawa kimia	Bahan uji			
	ekstrak	<i>n</i> -heksan	Etil asetat	Air
FLA FON OID	<input checked="" type="checkbox"/> 	<input type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> 
POL IFEN OL	<input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> 
ALK ALO ID	<input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> 
TER PEN OID	<input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> 	<input checked="" type="checkbox"/> 	<input type="checkbox"/> 

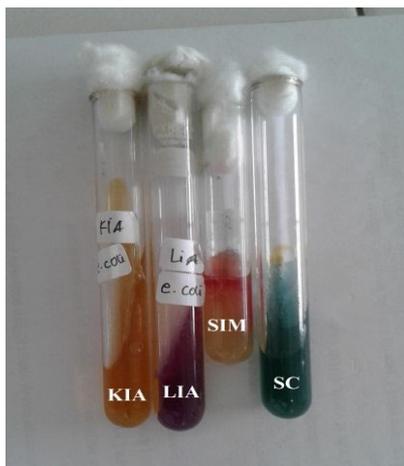
**Lampiran 5. Foto hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922**

Media EA      Koloni *E. coli*  
(merah kilap logam)      Bakteri batang berderet  
(warna merah)

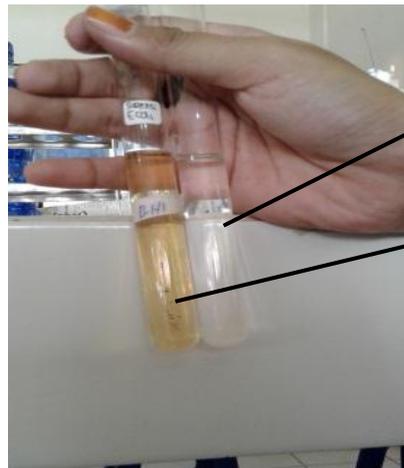


Morfologi bakteri *E. coli*

Pewarnaan Gram bakteri *E. coli*



Uji biokimia



suspensi  
Mc.Farland  
0,5

suspensi  
bakteri *E. coli*

Suspensi bakteri *E. coli* pada media  
BHI dan Mc.Farland

**Lampiran 6. Foto pengenceran ekstrak etanol, fraksi n-Heksan, etil asetat dan air**



**Lampiran 7. Foto alat *Moisture balance*, evaporator dan corong pisah, timbangan, oven, vortex, autoklaf, inkas, inkubator, mikroskop.**



***Moisture balance***



**evaporator**



**oven**



**corong pisah**



Inkubator



Autoklaf



Vorteks



Mikroskop

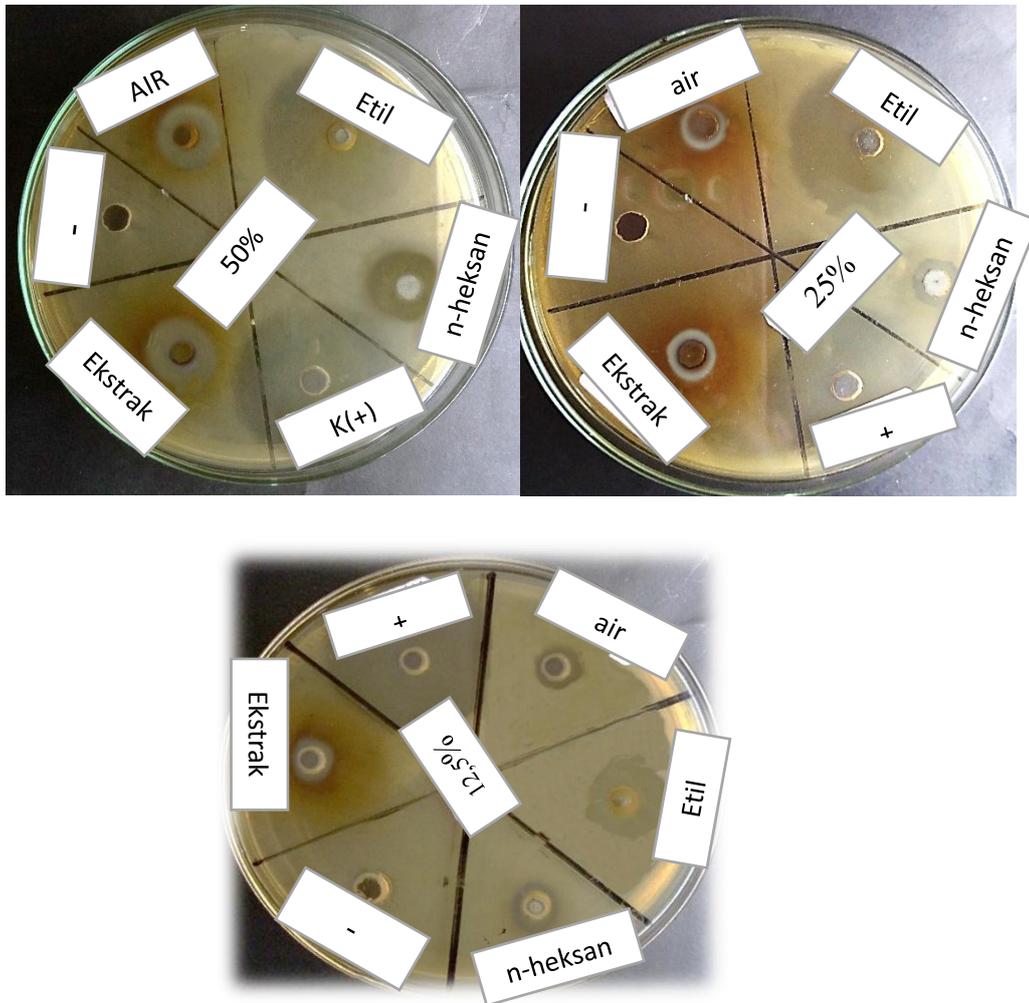


Timbangan analitik



inkas

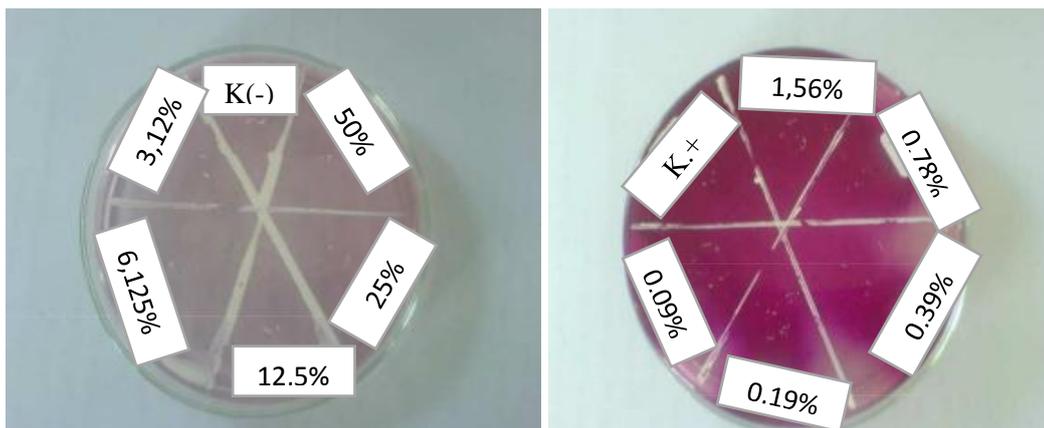
Lampiran 8. Pengenceran difusi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, air, kontrol negatif dan kontrol positif dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%



**Lampiran 9. Foto hasil uji dilusi fraksi teraktif terhadap *Escherichia coli***



Keterangan: pengenceran dilusi fraksi teraktif etil asetat konsentrasi 50%



**Lampiran 10. Perhitungan presentase bobot kering terhadap bobot basah daun murbei**

<b>Bobot basah</b>	<b>Bobot kering</b>	<b>Rendemen</b>
5000 gram	3000 gram	60%

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen serbuk} &= \frac{\text{bobot kering (g)}}{\text{bobot basah (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{3000 \text{ (g)}}{5000 \text{ (g)}} \times 100\% \\
 &= 60\%
 \end{aligned}$$

**Lampiran 11. Perhitungan penetapan kadar lembab serbuk daun murbei**

<b>Replikasi</b>	<b>Berat awal serbuk (gram)</b>	<b>Berat akhir serbuk (gram)</b>	<b>Kadar lembab (%)</b>
<b>1</b>	<b>2,00</b>	<b>1,8</b>	<b>5 %</b>
<b>2</b>	<b>2,00</b>	<b>1,8</b>	<b>5 %</b>
<b>3</b>	<b>2,00</b>	<b>1,6</b>	<b>7 %</b>
	<b>Rata-rata =</b>		<b>5,67 %</b>

$$\text{Rata-rata kadar lembab serbuk daun murbei} = \frac{5,0 + 7,0 + 5,0}{3} = 5,67\%$$

**Lampiran 12. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun murbei**

<b>Berat sampel</b>	<b>Bobot ekstrak</b>	<b>Rendemen ekstrak (% b/v)</b>
<b>800 gram</b>	<b>361,59 gram</b>	<b>45,19%</b>

Rendemen hasil ekstrak etanol daun murbei yang diperoleh adalah 45,19%.

Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun murbei:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (gram)}}{\text{berat sampel (gram)}} \times 100\%$$

$$= \frac{361,59 \text{ gram}}{800 \text{ gram}} \times 100\% = 45,19\%$$

Kesimpulan : prosentase rata-rata rendemen ekstrak etanol daun murbei adalah 45,19%

### Lampiran 13. Hasil fraksi ekstrak etanol daun murbei

Fraksi <i>n</i> - heksan			
No	Bobot ekstrak (g)	Bobot Fraksi (g)	Rendemen(%)
1	10,01	0,84	8,4 %
2	10,01	0,78	7,8 %
3	10,02	0,75	7,5 %
	Rata- rata		7,9 %

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot fraksi (gram)}}{\text{berat ekstrak (gram)}} \times 100\%$$

- Rendemen =  $\frac{0,84 \text{ (gram)}}{10 \text{ (gram)}} \times 100\% = 8,4\%$
- Rendemen =  $\frac{0,78 \text{ (gram)}}{10 \text{ (gram)}} \times 100\% = 7,8\%$
- Rendemen =  $\frac{0,75 \text{ (gram)}}{10 \text{ (gram)}} \times 100\% = 7,5\%$

Kesimpulan: prosentase rata-rata fraksi *n*- heksan dari ekstrak daun murbei adalah 7,9%

### Fraksi etil asetat dari ekstrak daun murbei

No	Bobot ekstrak (g)	Bobot Fraksi (g)	Rendemen (%)
1	10,01	1,32	13,2 %
2	10,01	1,35	13,5 %
3	10,02	1,29	12,9 %
	Rata- rata =		13,2 %

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot fraksi (gram)}}{\text{berat ekstrak (gram)}} \times 100\%$$

- Rendemen =  $\frac{1,32 \text{ (gram)}}{10 \text{ (gram)}} \times 100\% = 13,2\%$
- Rendemen =  $\frac{1,35 \text{ (gram)}}{10 \text{ (gram)}} \times 100\% = 13,5\%$
- Rendemen =  $\frac{1,29 \text{ (gram)}}{10 \text{ (gram)}} \times 100\% = 12,9\%$

Kesimpulan: prosentase rata-rata fraksi etil asetat dari ekstrak daun murbei adalah 13,2%.

### Fraksi air dari ekstrak daun murbei

No	Bobot ekstrak (g)	Bobot Fraksi (g)	Rendemen (%)
1	10,01	5,22	52,2 %
2	10,01	5,31	53,1 %
3	10,02	5,30	53,0 %
	Rata- rata		52,7 %

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot fraksi (gram)}}{\text{berat ekstrak (gram)}} \times 100\%$$

- Rendemen =  $\frac{5,22 \text{ (gram)}}{10 \text{ (gram)}} \times 100 \% = 52,2\%$
- Rendemen =  $\frac{5,31 \text{ (gram)}}{10 \text{ (gram)}} \times 100 \% = 53,1\%$
- Rendemen =  $\frac{5,30 \text{ (gram)}}{10 \text{ (gram)}} \times 100 \% = 53,0\%$

Kesimpulan: prosentase rata-rata fraksi air dari ekstrak daun murbei adalah 52,7%.

### Lampiran 14. Perhitungan kotrimoksazol

Perhitungan kontrol positif suspensi kotrimoksazol

Kotrimoksazol terdiri dari 200 mg Sulfametaksazol dan 40 mg Trimetropim/5ml.

Memakai pipet droper 50  $\mu$ l.

$$\text{Sufametaksazol} = \frac{200 \text{ mg}}{5000 \mu\text{l}} = \frac{X \text{ mg}}{50 \mu\text{l}}$$

$$X = \frac{10000 \text{ mg}}{5000 \mu\text{l}} = 2 \text{ mg}$$

$$\text{Trimetropim} = \frac{40 \text{ mg}}{5000 \mu\text{l}} = \frac{X \text{ mg}}{50 \mu\text{l}}$$

$$X = \frac{2000 \text{ mg}}{5000 \mu\text{l}} = 0,4 \text{ mg}$$

Dalam persen

Sulfametaksazol 200 mg

$$\frac{200 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} = 40 \text{ mg/ml}$$

$$= 0,04 \text{ g/ml}$$

$$= 4\% \text{ b/v}$$

Trimetropim 40 mg

$$\frac{40 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} = 8 \text{ mg/ml}$$

$$= 0,008 \text{ g/ml}$$

$$= 0,8\% \text{ b/v}$$

Jadi dalam 5ml terdapat kombinasi Sulfametaksazol dan Trimetropim sebesar 4 %b/v dan 0,8% b/v dalam suspensi kotrimoksazol.

### Lampiran 15. Perhitungan pengenceran DMSO 3% (*Dimethyl Sulfoxida*)

Pembuatan DMSO konsentrasi 3%:

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 100\% &= 100 \text{ ml} \cdot 3\% \\ V_1 &= \frac{100 \text{ ml} \cdot 3\%}{100\%} \\ &= \frac{300 \text{ ml}}{100} = 3 \text{ ml} \end{aligned}$$

Dipipet 3 ml dari larutan awal (100%) kemudian ditambah aquadest steril sampai 100 ml

### Lampiran 16. Pembuatan sediaan untuk uji difusi dan dilusi

#### A. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak dan Fraksi (*Morus alba* L.) untuk uji Difusi

- **Konsentrasi Ekstrak dan Fraksi 50%**

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

Ditimbang 1 gram ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air daun murbei kemudian dimasukkan ke dalam vial dan diencerkan dengan DMSO 3% sebanyak 2 ml.

- **Konsentrasi Ekstrak dan Fraksi 25%**

$$\begin{aligned} 25\% \text{ b/v} &= 25 \text{ gram} / 100 \text{ ml} \\ &= 0,5 \text{ g} / 2 \text{ ml} \end{aligned}$$

Ditimbang 0,5 gram ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air daun murbei kemudian dimasukkan ke dalam vial dan diencerkan dengan DMSO 3% sebanyak 2 ml.

- **Konsentrasi Ekstrak dan Fraksi 12,5%**

$$\begin{aligned} 12,5\% \text{ b/v} &= 12,5 \text{ gram} / 100 \text{ ml} \\ &= 0,25 \text{ g} / 2 \text{ ml} \end{aligned}$$

Ditimbang 0,25 gram ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air daun murbei kemudian dimasukkan ke dalam vial dan diencerkan dengan DMSO 3% sebanyak 2 ml.

## B. Perhitungan Konsentrasi Fraksi etil asetat Untuk Uji Dilusi

- **Konsentrasi 50%**

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 50\% &= 1 \text{ ml} \cdot 25\% \\ V_1 &= \frac{1 \times 25\%}{50\%} \\ V_1 &= 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

- **Konsentrasi 25%**

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 25\% &= 1 \text{ ml} \cdot 12,5\% \\ V_1 &= \frac{1 \times 12,5\%}{50\%} \\ V_1 &= 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

- **Konsentrasi 12,5%**

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 12,5\% &= 1 \text{ ml} \cdot 6,25\% \\ V_1 &= \frac{1 \times 6,25\%}{50\%} \\ V_1 &= 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

- **Konsentrasi 6,25%**

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 6,25\% &= 1 \text{ ml} \cdot 3,125\% \\ V_1 &= \frac{1 \times 3,125\%}{50\%} \\ V_1 &= 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

- **Konsentrasi 3,125%**

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 3,125\% &= 1 \text{ ml} \cdot 1,563\% \\ V_1 &= \frac{1 \times 1,563\%}{50\%} \quad V_1 = 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

- **Konsentrasi 1,563%**

$$\begin{aligned} V_1 \cdot C_1 &= V_2 \cdot C_2 \\ V_1 \cdot 1,563\% &= 1 \text{ ml} \cdot 0,781\% \\ V_1 &= \frac{1 \times 0,781\%}{50\%} \end{aligned}$$

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

- **Konsentrasi 0,781%**

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 0,781\% = 1 \text{ ml. } 0,391\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 0,391 \%}{50 \%}$$

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

- **Konsentrasi 0,391%**

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 0,391\% = 1 \text{ ml. } 0,196\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 0,196 \%}{50 \%}$$

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

- **Konsentrasi 0,196%**

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 0,196\% = 1 \text{ ml. } 0,098\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 0,098 \%}{50 \%}$$

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

- **Konsentrasi 0,098%**

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

$$V_1. 0,098\% = 1 \text{ ml. } 0,049\%$$

$$V_1 = \frac{1 \times 0,049 \%}{50 \%}$$

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

kontrol negatif (-) berisi 1 ml fraksi etil asetat

kontrol positif (+) berisi 1 ml suspensi bakteri

### Lampiran 17. Formulasi dan pembuatan media

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

Brain infusion	12,5 gram
Heart infusion	5,0 gram
Protease peptone	10,0 gram
Glucose	2,0 gram
Sodium choride	5,0 gram
di-sodium hydrogen phosphate	2,5 gram
aquadest ad	1000 ml

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

b. Formulasi dan pembuatan Endo Agar

Pepton for meat	10,0 gram
Di potassium hydrogen phosfat	3,5 gram
Laktosa	10,0 gram
Sodium sulfit	2,5 gram
Fuchsin	0,4 gram
Agar-agar	12,5 gram

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai mendidih dan reagen larut sempurna, kemudian ditambahkan Natrium Sulfit 1ml, lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan pada cawan petri pH 7,4.

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

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

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

d. Sulfida Indol Motility (SIM)

Pepton from casein	20 gram
Pepton from meat	6 gram
Ammonium Iron (II) citrate	0,2 gram
Sodium thiosulfate	0,2 gram
Agar-agar	0,2 gram
Aquadest	ad 1000 ml,

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan pada cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

e. Klinger Iron Agar (KIA)

Pepton from casein	15 gram
Pepton from meat	5 gram
Ammonium Iron (II) citrate	0,5 gram
Meat extract	3 gram
Yeast extract	3 gram
Sodium chloride	5 gram
Laktosa	10 gram
Sodium thiosulfate	0,5 gram
Phenol red	0,024 gram
Agar-agar	12 gram
Aquadest	ad 1000 ml,

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan pada cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

## f. Lysine Iron Agar (LIA)

Pepton from casein	5	gram
Yeast extract	3	gram
Glukosa	1	gram
Lysin monohydrochloride	10	gram
Sodium thiosulfate	0,04	gram
Ammonium Iron (II) citrate	0,05	gram
Bromo cresol purple	0,02	gram
Agar-agar	12,5	gram
Aquadest	ad 1000 ml,	

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan pada cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

## g. Citrat Agar

Ammonium hydrogen fosfat	1	gram
di-potassium hydrogen fosfate	1	gram
Sodium chloride	5	gram
Magnesium sulfat	0,2	gram
Bromo thymol blue	0,08	gram
Agar-agar	12,5	gram
Aquadest	ad 1000 ml,	

Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan pada cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

**Lampiran 18. Analisis data uji Anova antara ekstrak etanol, fraksi *n*-Heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dengan konsentrasi 50%, 25%, 12.5% pada bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922**

**NPar Tests**

**Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Ekstrak etanol,Fraksi <i>n</i> -heksan,Fraksi etil asetat, Fraksi air dan Kotrimoksazol	39	7,00	3,791	1	13
Diameter	39	13,85	8,308	4	35

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Ekstrak etanol,Fraksi <i>n</i> -heksan,Fraksi etil asetat, Fraksi air dan Kotrimoksazol	Diameter
N		39	39
Normal Parameters(a,b)	Mean	7,00	13,85
	Std. Deviation	3,791	8,308
Most Extreme Differences	Absolute	,093	,152
	Positive	,093	,152
	Negative	-,093	-,118
Kolmogorov-Smirnov Z		,583	,949
Asymp. Sig. (2-tailed)		,886	,328

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2573,077	12	214,423	111,500	,000
Within Groups	50,000	26	1,923		
Total	2623,077	38			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter

	(I) Ekstrak etanol,Fraksi n-heksan,Fraksi etil asetat, Fraksi air dan Kotrimoksazol	(J) Ekstrak etanol,Fraksi n-heksan,Fraksi etil asetat, Fraksi air dan Kotrimoksazol	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Ekstrak etanol 50%	Fraksi n-heksan 50%	-3,00	1,132	,332	-7,11	1,11
		Fraksi etil asetat 50%	-9,33(*)	1,132	,000	-13,45	-5,22
		Fraksi air 50%	4,00	1,132	,062	-,11	8,11
		Ekstrak etanol 25%	2,33	1,132	,687	-1,78	6,45
		Fraksi n-heksan 25%	3,33	1,132	,202	-,78	7,45
		Fraksi etil asetat 25%	-5,67(*)	1,132	,002	-9,78	-1,55
		Fraksi air 25%	8,33(*)	1,132	,000	4,22	12,45
		Ekstrak etanol 12.5%	3,33	1,132	,202	-,78	7,45
		Fraksi n-heksan 12.5%	6,67(*)	1,132	,000	2,55	10,78
		Fraksi etil asetat 12.5%	-4,33(*)	1,132	,032	-8,45	-,22
		Fraksi air 12.5%	9,33(*)	1,132	,000	5,22	13,45
		Kotrimoksazol	-21,67(*)	1,132	,000	-25,78	-17,55
	Fraksi n-heksan 50%	Ekstrak etanol 50%	3,00	1,132	,332	-1,11	7,11
		Fraksi etil asetat 50%	-6,33(*)	1,132	,000	-10,45	-2,22
		Fraksi air 50%	7,00(*)	1,132	,000	2,89	11,11
		Ekstrak etanol 25%	5,33(*)	1,132	,004	1,22	9,45
		Fraksi n-heksan 25%	6,33(*)	1,132	,000	2,22	10,45
		Fraksi etil asetat 25%	-2,67	1,132	,501	-6,78	1,45
		Fraksi air 25%	11,33(*)	1,132	,000	7,22	15,45
		Ekstrak etanol 12.5%	6,33(*)	1,132	,000	2,22	10,45
		Fraksi n-heksan 12.5%	9,67(*)	1,132	,000	5,55	13,78
		Fraksi etil asetat 12.5%	-1,33	1,132	,991	-5,45	2,78
		Fraksi air 12.5%	12,33(*)	1,132	,000	8,22	16,45
		Kotrimoksazol	-18,67(*)	1,132	,000	-22,78	-14,55
	Fraksi etil asetat 50%	Ekstrak etanol 50%	9,33(*)	1,132	,000	5,22	13,45
		Fraksi n-heksan 50%	6,33(*)	1,132	,000	2,22	10,45
		Fraksi air 50%	13,33(*)	1,132	,000	9,22	17,45
		Ekstrak etanol 25%	11,67(*)	1,132	,000	7,55	15,78
		Fraksi n-heksan 25%	12,67(*)	1,132	,000	8,55	16,78
		Fraksi etil asetat 25%	3,67	1,132	,115	-,45	7,78
		Fraksi air 25%	17,67(*)	1,132	,000	13,55	21,78
		Ekstrak etanol 12.5%	12,67(*)	1,132	,000	8,55	16,78
		Fraksi n-heksan 12.5%	16,00(*)	1,132	,000	11,89	20,11
		Fraksi etil asetat 12.5%	5,00(*)	1,132	,008	,89	9,11
		Fraksi air 12.5%	18,67(*)	1,132	,000	14,55	22,78
		Kotrimoksazol	-12,33(*)	1,132	,000	-16,45	-8,22
	Fraksi air 50%	Ekstrak etanol 50%	-4,00	1,132	,062	-8,11	,11
		Fraksi n-heksan 50%	-7,00(*)	1,132	,000	-11,11	-2,89
		Fraksi etil asetat 50%	-13,33(*)	1,132	,000	-17,45	-9,22
		Ekstrak etanol 25%	-1,67	1,132	,950	-5,78	2,45
		Fraksi n-heksan 25%	-,67	1,132	1,000	-4,78	3,45
		Fraksi etil asetat 25%	-9,67(*)	1,132	,000	-13,78	-5,55
Fraksi air 25%		4,33(*)	1,132	,032	,22	8,45	
Ekstrak etanol 12.5%		-,67	1,132	1,000	-4,78	3,45	
Fraksi n-heksan 12.5%		2,67	1,132	,501	-1,45	6,78	
Fraksi etil asetat 12.5%		-8,33(*)	1,132	,000	-12,45	-4,22	
Fraksi air 12.5%		5,33(*)	1,132	,004	1,22	9,45	
Kotrimoksazol		-25,67(*)	1,132	,000	-29,78	-21,55	

Ekstrak etanol 25%	Ekstrak etanol 50%	-2,33	1,132	,687	-6,45	1,78
	Fraksi n-heksan 50%	-5,33(*)	1,132	,004	-9,45	-1,22
	Fraksi etil asetat 50%	-11,67(*)	1,132	,000	-15,78	-7,55
	Fraksi air 50%	1,67	1,132	,950	-2,45	5,78
	Fraksi n-heksan 25%	1,00	1,132	,999	-3,11	5,11
	Fraksi etil asetat 25%	-8,00(*)	1,132	,000	-12,11	-3,89
	Fraksi air 25%	6,00(*)	1,132	,001	1,89	10,11
	Ekstrak etanol 12.5%	1,00	1,132	,999	-3,11	5,11
	Fraksi n-heksan 12.5%	4,33(*)	1,132	,032	,22	8,45
	Fraksi etil asetat 12.5%	-6,67(*)	1,132	,000	-10,78	-2,55
	Fraksi air 12.5%	7,00(*)	1,132	,000	2,89	11,11
	Kotrimoksazol	-24,00(*)	1,132	,000	-28,11	-19,89
Fraksi n- heksan 25%	Ekstrak etanol 50%	-3,33	1,132	,202	-7,45	,78
	Fraksi n-heksan 50%	-6,33(*)	1,132	,000	-10,45	-2,22
	Fraksi etil asetat 50%	-12,67(*)	1,132	,000	-16,78	-8,55
	Fraksi air 50%	,67	1,132	1,000	-3,45	4,78
	Ekstrak etanol 25%	-1,00	1,132	,999	-5,11	3,11
	Fraksi etil asetat 25%	-9,00(*)	1,132	,000	-13,11	-4,89
	Fraksi air 25%	5,00(*)	1,132	,008	,89	9,11
	Ekstrak etanol 12.5%	,00	1,132	1,000	-4,11	4,11
	Fraksi n-heksan 12.5%	3,33	1,132	,202	-,78	7,45
	Fraksi etil asetat 12.5%	-7,67(*)	1,132	,000	-11,78	-3,55
	Fraksi air 12.5%	6,00(*)	1,132	,001	1,89	10,11
	Kotrimoksazol	-25,00(*)	1,132	,000	-29,11	-20,89
Fraksi etil asetat 25%	Ekstrak etanol 50%	5,67(*)	1,132	,002	1,55	9,78
	Fraksi n-heksan 50%	2,67	1,132	,501	-1,45	6,78
	Fraksi etil asetat 50%	-3,67	1,132	,115	-7,78	,45
	Fraksi air 50%	9,67(*)	1,132	,000	5,55	13,78
	Ekstrak etanol 25%	8,00(*)	1,132	,000	3,89	12,11
	Fraksi n-heksan 25%	9,00(*)	1,132	,000	4,89	13,11
	Fraksi air 25%	14,00(*)	1,132	,000	9,89	18,11
	Ekstrak etanol 12.5%	9,00(*)	1,132	,000	4,89	13,11
	Fraksi n-heksan 12.5%	12,33(*)	1,132	,000	8,22	16,45
	Fraksi etil asetat 12.5%	1,33	1,132	,991	-2,78	5,45
	Fraksi air 12.5%	15,00(*)	1,132	,000	10,89	19,11
	Kotrimoksazol	-16,00(*)	1,132	,000	-20,11	-11,89
Fraksi air 25%	Ekstrak etanol 50%	-8,33(*)	1,132	,000	-12,45	-4,22
	Fraksi n-heksan 50%	-11,33(*)	1,132	,000	-15,45	-7,22
	Fraksi etil asetat 50%	-17,67(*)	1,132	,000	-21,78	-13,55
	Fraksi air 50%	-4,33(*)	1,132	,032	-8,45	-,22
	Ekstrak etanol 25%	-6,00(*)	1,132	,001	-10,11	-1,89
	Fraksi n-heksan 25%	-5,00(*)	1,132	,008	-9,11	-,89
	Fraksi etil asetat 25%	-14,00(*)	1,132	,000	-18,11	-9,89
	Ekstrak etanol 12.5%	-5,00(*)	1,132	,008	-9,11	-,89
	Fraksi n-heksan 12.5%	-1,67	1,132	,950	-5,78	2,45
	Fraksi etil asetat 12.5%	-12,67(*)	1,132	,000	-16,78	-8,55
	Fraksi air 12.5%	1,00	1,132	,999	-3,11	5,11
	Kotrimoksazol	-30,00(*)	1,132	,000	-34,11	-25,89
Ekstrak etanol 12.5%	Ekstrak etanol 50%	-3,33	1,132	,202	-7,45	,78
	Fraksi n-heksan 50%	-6,33(*)	1,132	,000	-10,45	-2,22
	Fraksi etil asetat 50%	-12,67(*)	1,132	,000	-16,78	-8,55
	Fraksi air 50%	,67	1,132	1,000	-3,45	4,78
	Ekstrak etanol 25%	-1,00	1,132	,999	-5,11	3,11
	Fraksi n-heksan 25%	,00	1,132	1,000	-4,11	4,11
	Fraksi etil asetat 25%	-9,00(*)	1,132	,000	-13,11	-4,89
	Fraksi air 25%	5,00(*)	1,132	,008	,89	9,11
	Fraksi n-heksan 12.5%	3,33	1,132	,202	-,78	7,45
	Fraksi etil asetat 12.5%	-7,67(*)	1,132	,000	-11,78	-3,55
	Fraksi air 12.5%	6,00(*)	1,132	,001	1,89	10,11
	Kotrimoksazol	-25,00(*)	1,132	,000	-29,11	-20,89

	Fraksi n-heksan 12.5%	Ekstrak etanol 50%	-6,67(*)	1,132	,000	-10,78	-2,55
		Fraksi n-heksan 50%	-9,67(*)	1,132	,000	-13,78	-5,55
		Fraksi etil asetat 50%	-16,00(*)	1,132	,000	-20,11	-11,89
		Fraksi air 50%	-2,67	1,132	,501	-6,78	1,45
		Ekstrak etanol 25%	-4,33(*)	1,132	,032	-8,45	-,22
		Fraksi n-heksan 25%	-3,33	1,132	,202	-7,45	,78
		Fraksi etil asetat 25%	-12,33(*)	1,132	,000	-16,45	-8,22
		Fraksi air 25%	1,67	1,132	,950	-2,45	5,78
		Ekstrak etanol 12.5%	-3,33	1,132	,202	-7,45	,78
		Fraksi etil asetat 12.5%	-11,00(*)	1,132	,000	-15,11	-6,89
		Fraksi air 12.5%	2,67	1,132	,501	-1,45	6,78
		Kotrimoksazol	-28,33(*)	1,132	,000	-32,45	-24,22
	Fraksi etil asetat 12.5%	Ekstrak etanol 50%	4,33(*)	1,132	,032	,22	8,45
		Fraksi n-heksan 50%	1,33	1,132	,991	-2,78	5,45
		Fraksi etil asetat 50%	-5,00(*)	1,132	,008	-9,11	-,89
		Fraksi air 50%	8,33(*)	1,132	,000	4,22	12,45
		Ekstrak etanol 25%	6,67(*)	1,132	,000	2,55	10,78
		Fraksi n-heksan 25%	7,67(*)	1,132	,000	3,55	11,78
		Fraksi etil asetat 25%	-1,33	1,132	,991	-5,45	2,78
		Fraksi air 25%	12,67(*)	1,132	,000	8,55	16,78
		Ekstrak etanol 12.5%	7,67(*)	1,132	,000	3,55	11,78
		Fraksi n-heksan 12.5%	11,00(*)	1,132	,000	6,89	15,11
		Fraksi air 12.5%	13,67(*)	1,132	,000	9,55	17,78
		Kotrimoksazol	-17,33(*)	1,132	,000	-21,45	-13,22
	Fraksi air 12.5%	Ekstrak etanol 50%	-9,33(*)	1,132	,000	-13,45	-5,22
		Fraksi n-heksan 50%	-12,33(*)	1,132	,000	-16,45	-8,22
		Fraksi etil asetat 50%	-18,67(*)	1,132	,000	-22,78	-14,55
		Fraksi air 50%	-5,33(*)	1,132	,004	-9,45	-1,22
		Ekstrak etanol 25%	-7,00(*)	1,132	,000	-11,11	-2,89
		Fraksi n-heksan 25%	-6,00(*)	1,132	,001	-10,11	-1,89
		Fraksi etil asetat 25%	-15,00(*)	1,132	,000	-19,11	-10,89
		Fraksi air 25%	-1,00	1,132	,999	-5,11	3,11
		Ekstrak etanol 12.5%	-6,00(*)	1,132	,001	-10,11	-1,89
		Fraksi n-heksan 12.5%	-2,67	1,132	,501	-6,78	1,45
		Fraksi etil asetat 12.5%	-13,67(*)	1,132	,000	-17,78	-9,55
		Kotrimoksazol	-31,00(*)	1,132	,000	-35,11	-26,89
	Kotrimoksazol	Ekstrak etanol 50%	21,67(*)	1,132	,000	17,55	25,78
		Fraksi n-heksan 50%	18,67(*)	1,132	,000	14,55	22,78
		Fraksi etil asetat 50%	12,33(*)	1,132	,000	8,22	16,45
		Fraksi air 50%	25,67(*)	1,132	,000	21,55	29,78
		Ekstrak etanol 25%	24,00(*)	1,132	,000	19,89	28,11
		Fraksi n-heksan 25%	25,00(*)	1,132	,000	20,89	29,11
		Fraksi etil asetat 25%	16,00(*)	1,132	,000	11,89	20,11
		Fraksi air 25%	30,00(*)	1,132	,000	25,89	34,11
		Ekstrak etanol 12.5%	25,00(*)	1,132	,000	20,89	29,11
		Fraksi n-heksan 12.5%	28,33(*)	1,132	,000	24,22	32,45
		Fraksi etil asetat 12.5%	17,33(*)	1,132	,000	13,22	21,45
		Fraksi air 12.5%	31,00(*)	1,132	,000	26,89	35,11
Bonferroni	Ekstrak etanol 50%	Fraksi n-heksan 50%	-3,00	1,132	1,000	-7,39	1,39
		Fraksi etil asetat 50%	-9,33(*)	1,132	,000	-13,73	-4,94
		Fraksi air 50%	4,00	1,132	,122	-,39	8,39
		Ekstrak etanol 25%	2,33	1,132	1,000	-2,06	6,73
		Fraksi n-heksan 25%	3,33	1,132	,526	-1,06	7,73
		Fraksi etil asetat 25%	-5,67(*)	1,132	,003	-10,06	-1,27
		Fraksi air 25%	8,33(*)	1,132	,000	3,94	12,73
		Ekstrak etanol 12.5%	3,33	1,132	,526	-1,06	7,73
		Fraksi n-heksan 12.5%	6,67(*)	1,132	,000	2,27	11,06
		Fraksi etil asetat 12.5%	-4,33	1,132	,057	-8,73	,06
		Fraksi air 12.5%	9,33(*)	1,132	,000	4,94	13,73
		Kotrimoksazol	-21,67(*)	1,132	,000	-26,06	-17,27

Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	Ekstrak etanol 50%	3,00	1,132	1,000	-1,39	7,39
	Fraksi etil asetat 50%	-6,33(*)	1,132	,001	-10,73	-1,94
	Fraksi air 50%	7,00(*)	1,132	,000	2,61	11,39
	Ekstrak etanol 25%	5,33(*)	1,132	,006	,94	9,73
	Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	6,33(*)	1,132	,001	1,94	10,73
	Fraksi etil asetat 25%	-2,67	1,132	1,000	-7,06	1,73
	Fraksi air 25%	11,33(*)	1,132	,000	6,94	15,73
	Ekstrak etanol 12.5%	6,33(*)	1,132	,001	1,94	10,73
	Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%	9,67(*)	1,132	,000	5,27	14,06
	Fraksi etil asetat 12.5%	-1,33	1,132	1,000	-5,73	3,06
Fraksi etil asetat 50%	Fraksi air 12.5%	12,33(*)	1,132	,000	7,94	16,73
	Kotrimoksazol	-18,67(*)	1,132	,000	-23,06	-14,27
	Ekstrak etanol 50%	9,33(*)	1,132	,000	4,94	13,73
	Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	6,33(*)	1,132	,001	1,94	10,73
	Fraksi air 50%	13,33(*)	1,132	,000	8,94	17,73
	Ekstrak etanol 25%	11,67(*)	1,132	,000	7,27	16,06
	Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	12,67(*)	1,132	,000	8,27	17,06
	Fraksi etil asetat 25%	3,67	1,132	,256	-,73	8,06
	Fraksi air 25%	17,67(*)	1,132	,000	13,27	22,06
	Ekstrak etanol 12.5%	12,67(*)	1,132	,000	8,27	17,06
Fraksi air 50%	Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%	16,00(*)	1,132	,000	11,61	20,39
	Fraksi etil asetat 12.5%	5,00(*)	1,132	,012	,61	9,39
	Fraksi air 12.5%	18,67(*)	1,132	,000	14,27	23,06
	Kotrimoksazol	-12,33(*)	1,132	,000	-16,73	-7,94
	Ekstrak etanol 50%	-4,00	1,132	,122	-8,39	,39
	Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	-7,00(*)	1,132	,000	-11,39	-2,61
	Fraksi etil asetat 50%	-13,33(*)	1,132	,000	-17,73	-8,94
	Ekstrak etanol 25%	-1,67	1,132	1,000	-6,06	2,73
	Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	-,67	1,132	1,000	-5,06	3,73
	Fraksi etil asetat 25%	-9,67(*)	1,132	,000	-14,06	-5,27
Ekstrak etanol 25%	Fraksi air 25%	4,33	1,132	,057	-,06	8,73
	Ekstrak etanol 12.5%	-,67	1,132	1,000	-5,06	3,73
	Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%	2,67	1,132	1,000	-1,73	7,06
	Fraksi etil asetat 12.5%	-8,33(*)	1,132	,000	-12,73	-3,94
	Fraksi air 12.5%	5,33(*)	1,132	,006	,94	9,73
	Kotrimoksazol	-25,67(*)	1,132	,000	-30,06	-21,27
	Ekstrak etanol 50%	-2,33	1,132	1,000	-6,73	2,06
	Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	-5,33(*)	1,132	,006	-9,73	-,94
	Fraksi etil asetat 50%	-11,67(*)	1,132	,000	-16,06	-7,27
	Fraksi air 50%	1,67	1,132	1,000	-2,73	6,06
Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	1,00	1,132	1,000	-3,39	5,39
	Fraksi etil asetat 25%	-8,00(*)	1,132	,000	-12,39	-3,61
	Fraksi air 25%	6,00(*)	1,132	,001	1,61	10,39
	Ekstrak etanol 12.5%	1,00	1,132	1,000	-3,39	5,39
	Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%	4,33	1,132	,057	-,06	8,73
	Fraksi etil asetat 12.5%	-6,67(*)	1,132	,000	-11,06	-2,27
	Fraksi air 12.5%	7,00(*)	1,132	,000	2,61	11,39
	Kotrimoksazol	-24,00(*)	1,132	,000	-28,39	-19,61
	Ekstrak etanol 50%	-3,33	1,132	,526	-7,73	1,06
	Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	-6,33(*)	1,132	,001	-10,73	-1,94
Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	Fraksi etil asetat 50%	-12,67(*)	1,132	,000	-17,06	-8,27
	Fraksi air 50%	,67	1,132	1,000	-3,73	5,06
	Ekstrak etanol 25%	-1,00	1,132	1,000	-5,39	3,39
	Fraksi etil asetat 25%	-9,00(*)	1,132	,000	-13,39	-4,61
	Fraksi air 25%	5,00(*)	1,132	,012	,61	9,39
	Ekstrak etanol 12.5%	,00	1,132	1,000	-4,39	4,39
	Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%	3,33	1,132	,526	-1,06	7,73
	Fraksi etil asetat 12.5%	-7,67(*)	1,132	,000	-12,06	-3,27
	Fraksi air 12.5%	6,00(*)	1,132	,001	1,61	10,39
	Kotrimoksazol	-25,00(*)	1,132	,000	-29,39	-20,61

Fraksi etil asetat 25%	Ekstrak etanol 50%	5,67(*)	1,132	,003	1,27	10,06
	Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	2,67	1,132	1,000	-1,73	7,06
	Fraksi etil asetat 50%	-3,67	1,132	,256	-8,06	,73
	Fraksi air 50%	9,67(*)	1,132	,000	5,27	14,06
	Ekstrak etanol 25%	8,00(*)	1,132	,000	3,61	12,39
	Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	9,00(*)	1,132	,000	4,61	13,39
	Fraksi air 25%	14,00(*)	1,132	,000	9,61	18,39
	Ekstrak etanol 12.5%	9,00(*)	1,132	,000	4,61	13,39
	Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%	12,33(*)	1,132	,000	7,94	16,73
	Fraksi etil asetat 12.5%	1,33	1,132	1,000	-3,06	5,73
Fraksi air 25%	Fraksi air 12.5%	15,00(*)	1,132	,000	10,61	19,39
	Kotrimoksazol	-16,00(*)	1,132	,000	-20,39	-11,61
	Ekstrak etanol 50%	-8,33(*)	1,132	,000	-12,73	-3,94
	Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	-11,33(*)	1,132	,000	-15,73	-6,94
	Fraksi etil asetat 50%	-17,67(*)	1,132	,000	-22,06	-13,27
	Fraksi air 50%	-4,33	1,132	,057	-8,73	,06
	Ekstrak etanol 25%	-6,00(*)	1,132	,001	-10,39	-1,61
	Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	-5,00(*)	1,132	,012	-9,39	-,61
	Fraksi etil asetat 25%	-14,00(*)	1,132	,000	-18,39	-9,61
	Ekstrak etanol 12.5%	-5,00(*)	1,132	,012	-9,39	-,61
Ekstrak etanol 12.5%	Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%	-1,67	1,132	1,000	-6,06	2,73
	Fraksi etil asetat 12.5%	-12,67(*)	1,132	,000	-17,06	-8,27
	Fraksi air 12.5%	1,00	1,132	1,000	-3,39	5,39
	Kotrimoksazol	-30,00(*)	1,132	,000	-34,39	-25,61
	Ekstrak etanol 50%	-3,33	1,132	,526	-7,73	1,06
	Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	-6,33(*)	1,132	,001	-10,73	-1,94
	Fraksi etil asetat 50%	-12,67(*)	1,132	,000	-17,06	-8,27
	Fraksi air 50%	,67	1,132	1,000	-3,73	5,06
	Ekstrak etanol 25%	-1,00	1,132	1,000	-5,39	3,39
	Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	,00	1,132	1,000	-4,39	4,39
Fraksi <i>n</i> - heksan 12.5%	Fraksi etil asetat 25%	-9,00(*)	1,132	,000	-13,39	-4,61
	Fraksi air 25%	5,00(*)	1,132	,012	,61	9,39
	Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%	3,33	1,132	,526	-1,06	7,73
	Fraksi etil asetat 12.5%	-7,67(*)	1,132	,000	-12,06	-3,27
	Fraksi air 12.5%	6,00(*)	1,132	,001	1,61	10,39
	Kotrimoksazol	-25,00(*)	1,132	,000	-29,39	-20,61
	Ekstrak etanol 50%	-6,67(*)	1,132	,000	-11,06	-2,27
	Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	-9,67(*)	1,132	,000	-14,06	-5,27
	Fraksi etil asetat 50%	-16,00(*)	1,132	,000	-20,39	-11,61
	Fraksi air 50%	-2,67	1,132	1,000	-7,06	1,73
Fraksi etil asetat 12.5%	Ekstrak etanol 25%	-4,33	1,132	,057	-8,73	,06
	Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	-3,33	1,132	,526	-7,73	1,06
	Fraksi etil asetat 25%	-12,33(*)	1,132	,000	-16,73	-7,94
	Fraksi air 25%	1,67	1,132	1,000	-2,73	6,06
	Ekstrak etanol 12.5%	-3,33	1,132	,526	-7,73	1,06
	Fraksi etil asetat 12.5%	-11,00(*)	1,132	,000	-15,39	-6,61
	Fraksi air 12.5%	2,67	1,132	1,000	-1,73	7,06
	Kotrimoksazol	-28,33(*)	1,132	,000	-32,73	-23,94
	Ekstrak etanol 50%	4,33	1,132	,057	-,06	8,73
	Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	1,33	1,132	1,000	-3,06	5,73
Fraksi etil asetat 50%	Fraksi etil asetat 50%	-5,00(*)	1,132	,012	-9,39	-,61
	Fraksi air 50%	8,33(*)	1,132	,000	3,94	12,73
	Ekstrak etanol 25%	6,67(*)	1,132	,000	2,27	11,06
	Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	7,67(*)	1,132	,000	3,27	12,06
	Fraksi etil asetat 25%	-1,33	1,132	1,000	-5,73	3,06
	Fraksi air 25%	12,67(*)	1,132	,000	8,27	17,06
	Ekstrak etanol 12.5%	7,67(*)	1,132	,000	3,27	12,06
	Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%	11,00(*)	1,132	,000	6,61	15,39
	Fraksi air 12.5%	13,67(*)	1,132	,000	9,27	18,06
	Kotrimoksazol	-17,33(*)	1,132	,000	-21,73	-12,94

Fraksi air 12.5%	Ekstrak etanol 50%	-9,33(*)	1,132	,000	-13,73	-4,94	
	Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	-12,33(*)	1,132	,000	-16,73	-7,94	
	Fraksi etil asetat 50%	-18,67(*)	1,132	,000	-23,06	-14,27	
	Fraksi air 50%	-5,33(*)	1,132	,006	-9,73	-,94	
	Ekstrak etanol 25%	-7,00(*)	1,132	,000	-11,39	-2,61	
	Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	-6,00(*)	1,132	,001	-10,39	-1,61	
	Fraksi etil asetat 25%	-15,00(*)	1,132	,000	-19,39	-10,61	
	Fraksi air 25%	-1,00	1,132	1,000	-5,39	3,39	
	Ekstrak etanol 12.5%	-6,00(*)	1,132	,001	-10,39	-1,61	
	Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%	-2,67	1,132	1,000	-7,06	1,73	
	Fraksi etil asetat 12.5%	-13,67(*)	1,132	,000	-18,06	-9,27	
	Kotrimoksazol	-31,00(*)	1,132	,000	-35,39	-26,61	
	Kotrimoksazol	Ekstrak etanol 50%	21,67(*)	1,132	,000	17,27	26,06
		Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	18,67(*)	1,132	,000	14,27	23,06
Fraksi etil asetat 50%		12,33(*)	1,132	,000	7,94	16,73	
Fraksi air 50%		25,67(*)	1,132	,000	21,27	30,06	
Ekstrak etanol 25%		24,00(*)	1,132	,000	19,61	28,39	
Fraksi <i>n</i> -heksan 25%		25,00(*)	1,132	,000	20,61	29,39	
Fraksi etil asetat 25%		16,00(*)	1,132	,000	11,61	20,39	
Fraksi air 25%		30,00(*)	1,132	,000	25,61	34,39	
Ekstrak etanol 12.5%		25,00(*)	1,132	,000	20,61	29,39	
Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%		28,33(*)	1,132	,000	23,94	32,73	
Fraksi etil asetat 12.5%		17,33(*)	1,132	,000	12,94	21,73	
Fraksi air 12.5%		31,00(*)	1,132	,000	26,61	35,39	

\* The mean difference is significant at the 0.05 level

## Homogeneous Subsets

### Diameter

### DIAMETER

	Ekstrak etanol,Fraksi <i>n</i> -heksan,Fraksi etil asetat, Fraksi air dan Kotrimoksazol	N	Subset for alpha = 0.05							
			1	2	3	4	5	6	7	
Tukey HSD(a)	Fraksi air 12.5%	3	4,00							
	Fraksi air 25%	3	5,00							
	Fraksi <i>n</i> -heksan 12.5%	3	6,67	6,67						
	Fraksi air 50%	3		9,33	9,33					
	Fraksi <i>n</i> -heksan 25%	3		10,00	10,00					
	Ekstrak etanol 12.5%	3		10,00	10,00					
	Ekstrak etanol 25%	3			11,00					
	Ekstrak etanol 50%	3			13,33	13,33				
	Fraksi <i>n</i> -heksan 50%	3				16,33	16,33			
	Fraksi etil asetat 12.5%	3					17,67			
	Fraksi etil asetat 25%	3					19,00	19,00		
	Fraksi etil asetat 50%	3						22,67		
	Kotrimoksazol	3								35,00
	Sig.			,501	,202	,062	,332	,501	,115	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.