UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, FRAKSI ETIL ASETAT, DAN FRAKSI AIR DARI EKSTRAK ETANOL 96% BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa* L.) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Oleh :

Lia Nurhastuti
20144188 A

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, FRAKSI ETIL ASETAT, DAN FRAKSI AIR DARI EKSTRAK ETANOL 96% BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa* L.) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

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

Oleh :

Lia Nurhastuti
20144188A

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018

PENGESAHAN SKRIPSI
berjudul

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, FRAKSI ETIL ASETAT, DAN FRAKSI AIR DARI EKSTRAK ETANOL 96% BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa* L.) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Oleh :
Lia Nurhastuti
20144188A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada Tanggal : 5 Juli 2018

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi

Dekan,

Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., MSc., Apt

Pembimbing Utama,

Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt

Pembimbing Pendamping,

Dra. Nony Puspawati, M.Si

Penguji :
1. Dr. Ana Indrayati, M.Si. 1. .....
2. Reslely Harjanti, M.Sc., Apt. 2. .....
3. Destik Wulandari, S.Pd., M.Si. 3. .....
4. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt. 4. .....

HALAMAN PERSEMBAHAN

" Sesungguhnya sesudah ada kesulitan itu ada kemudahan"

(QS AL-Insyirah : 6)

" Allah menghendaki untukmu kemudahan dan tidak menhendaki untukmu kesukaran"

(QS Al-Baqarah : 185)

"I'll spread my wings and I'll learn how to fly. I'll do what it takes till I touch the sky. I'll make a wish, take a risk, take a chance, make a change and breakaway"

(Klarkson)

Skripsi ini kupersembahkan untuk :

Ayah dan Ibuku, Keluargaku,

Sahabat, Almamater, Bangsa dan Negaraku

PERNYATAAN

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

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

Surkarta, Juni 2018

Tanda tangan

Lia Nurhastuti

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena berkat rahmat dan hidayat-Nya lah terselesaikannya skripsi yang berjudul **"Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan Air dari Ekstrak Etanol 96% Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853".** Skripsi ini disusun untuk meraih gelar Sarjana Farmasi Universitas Setia Budi di Surakarta.

Penyusunan skripsi ini tentunya tidak lepas dari bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis berterimakasih kepada :

1. Ir. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam penyusunan skripsi ini.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
3. Vivin Nopiyanti, M.Sc.Apt. selaku pembimbing utama yang telah memberikan pengarahan, motivasi dan bimbingan dalam penyusunan skripsi ini.
4. Dra. Nony Puspawati, M.Si., selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan pengarahan, motivasi, dan bimbingan dalam penyusunan skripsi ini.
5. Dosen penguji yang telah memberikan masukan demi kesempurnaan dalam skripsi ini.
6. Seluruh Dosen, Asisten Dosen, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi.
7. Kedua Orang Tuaku, kakak serta seluruh keluarga besarku yang telah memberikan pengorbanan, nasehat, pengertian, dan dukungan moril maupun materiil, serta semangat untuk segera menyelesaikan skripsi ini.
8. Rekan penelitian Brelian Odra, Desi, Damas dan Elizabet atas bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan penelitian skripsi ini.
9. Ayuzakia Darojat, Soraya, Betty, Lutfiana yang telah memberikan semangat kepadaku.

10. Teman – teman seperjuangan Farmasi Angkatan 2014 dan Teman-teman seperjuanganku FKK 3, Teori 2, teman teman KKN dan teman-teman S1 Farmasi yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu, serta semua pihak yang telah membantu kelancaran proses skripsi ini.

Demikian skripsi ini penulis buat, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis menerima kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan dan penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi peningkatan kualitas ilmu kefarmasian.

Surakarta, Juni 2018

Lia Nurhastuti

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

BAB I PENDAHULUAN 1

A. Latar Belakang 1
B. Perumusan Masalah 4
C. Tujuan Penelitian 4
D. Kegunaan Penelitian 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA 5

A. Tanaman Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.) 5
   1. Sistematika tanaman 5
   2. Nama umum/ dagang 5
   3. Deskripsi Tanaman 5
   4. Khasiat jinten hitam 5
   5. Kandungan kimia 6
      5.1. Alkaloid 6
      5.2. Flavonoid. 6
      5.3. Saponin. 6
      5.4. Steroid. 7
B. Simplisia 7
   1. Pengertian simplisia 7
   2. Pengeringan 7
C. Ekstraksi 8

1. Pengertian ekstraksi....8
2. Metode ekstraksi....8
3. Fraksinasi....9
4. Pelarut....9
D. Media....10
1. Pengertian....10
2. Macam-macam media....11
E. Sterilisasi....11
F. Siprofloksasin....12
1. Mekanisme kerja siprofloksasin....12
2. Efek samping siprofloksasin....12
3. Resistensi siprofloksasin....12
4. Dosis....12
G. Bakteri Uji....13
1. Sistematika *Pseudomonas aeruginosa*....13
2. Morfologi dan Identifikasi....13
3. Toksin *Pseudomonas aeruginosa*....14
4. Patogenesis....14
5. Mekanisme antibakteri....15
5.1. Penghambatan metabolisme sel bakteri.....15
5.2. Penghambatan sintesis dinding sel.....15
5.3. Perubahan permeabilitas membran sel bakteri.....16
5.4. Penghambatan sintesis protein sel bakteri.....16
5.5. Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri....16
6. Metode difusi....16
7. Metode dilusi....17
H. Landasan Teori....18
I. Hipotesis....20

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 variabel utama....22
C. Bahan dan Alat....23
1. Alat....23
1.1. Alat untuk pembuatan dan analisis serbuk simplisia.....23
1.2. Alat maserasi. Alat yang digunakan untuk maserasi adalah botol berwarna coklat, gelas ukur, kain flanel, kertas saring, *vaccum rotary evaporator*....23
1.3. Alat uji aktivitas antibakteri. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah ose platina, cawan petri, inkas, tabung reaksi, pipet tetes,

lampu spiritus, otoklaf, inkubator, kaca objek, mikroskop dan penggaris. 23
1.4. Alat identifikasi kandungan senyawa. 23
2. Bahan 23
2.1. Bahan utama. 23
2.2. Bahan kimia 23
2.3. Bakteri uji 23
2.4. Media 23
D. Jalannya Penelitian 24
1. Determinasi tanaman 24
2. Pembuatan serbuk biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 24
3. Penetapan susut pengeringan serbuk biji jinten hitam 24
4. Pembuatan ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 24
5. Fraksinasi ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 25
6. Pengujian kandungan senyawa kimia serbuk, ekstrak dan fraksi biji jinten hitam 25
6.1. Flavonoid. 25
6.2. Alkaloid. 26
6.3. Saponin. 26
6.4. Tanin. 26
6.5. Steroid. 26
7. Penetapan persen rendemen 26
8. Tes bebas etanol ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 26
9. Sterilisasi 26
10. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 27
10.1. Isolasi pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) 27
10.2. Identifikasi biokimia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 27
10.3. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode pengecatan. 28
11. Pengujian daya antibakteri dengan metode difusi 28
12. Pengujian daya antibakteri dengan metode dilusi 29
E. Analisis Data 29
F. Skema Jalannya Penelitian 30

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN 35

1. Hasil determinasi biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 35
2. Pembuatan serbuk biji jinten hitam 35
3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk biji jinten hitam 36
4. Hasil pembuatan ekstrak biji jinten hitam 36
5. Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi biji jinten hitam 37
6. Fraksinasi 37

7. Hasil uji kandungan kimia serbuk dan ekstrak biji jinten hitam 38
8. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 40
   8.1 Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara goresan 40
   8.2 Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara biokimia 40
   8.3 Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* metode pengecatan Gram 42
9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi 43
10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri 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. Pewarnaan Gram bakteri *Pseudomonas aeruginosa* 13

Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi jintan hitam (*Nigella sativa* L.) 30

Gambar 3. Skema jalannya penelitian 31

Gambar 4. Bagan kerja pembuatan suspensi bakteri dengan perbandingan 1:1000 32

Gambar 5. Uji aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 33

Gambar 6. Hasil koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) 40

Gambar 7. Hasil identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* secara mikroskopis 42

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah biji jinten hitam.....36

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk biji jinten hitam (Nigella sativa L.).....36

Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.).....36

Tabel 3. Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.).....37

Tabel 5. Persentase rendemen hasil fraksinasi biji jinten hitam *(Nigella sativa* L.).....38

Tabel 5. Hasil identifkasi kandungan kimia serbuk dan ektrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 38

Tabel 6. Hasil identifkasi kandungan kimia fraksi *n*-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 39

Tabel 7. Hasil identifikasi uji biokimia pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 40

Tabel 9. Hasil diameter zona hambat ekstrak, fraksi *n*-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 44

Tabel 10. Hasil aktivitas antibakteri fraksi teraktif biji jintan hitam terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 48

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Determinasi Biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 56

Lampiran 2. Foto biji dan serbuk jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 57

Lampiran 3. Gambar timbangan, mesin penggiling simplisia dan vortex 58

Lampiran 4. Gambar alat Sterling-bidwell, botol maserasi dan ayakan 40 59

Lampiran 5. Gambar alat oven binder, rotary evaporator, incubator, autoklaf dan ekstrak biji jinten hitam 60

Lampiran 6. Foto fraksinasi, hasil fraksinasi dan tes bebas etanol pada biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 61

Lampiran 7. Foto identifikasi senyawa serbuk dan ekstrak biji jinten hitam 62

Lampiran 8. Foto identifikasi senyawa fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.).....63

Lampiran 9. Foto hasil uji difusi.....65

Lampiran 10. Foto hasil uji dilusi 68

Lampiran 11. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 69

Lampiran 12. Hasil perhitungan persen rendemen kadar lembab serbuk 69

Lampiran 13. Hasil presentase ekstrak biji jinten hitam 69

Lampiran 14. Hasil perhitungan persen rendemen fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) 70

Lampiran 15. Formulasi dan pembuatan media.....71

Lampiran 16. Perhitungan pengenceran DMSO (*Dimethyl Sulfoxida*).....74

Lampiran 17. Pembuatan larutan stok uji difusi dengan berbagai konsentrasi 75

Lampiran 18. Pembuatan larutan stok dilusi.....76

Lampiran 19. Standard kekeruhan *mc farland*.....78

Lampiran 21. Analisis data hasil difusi.....79

INTISARI

HASTUTI, L.N., 2018 UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL 96% BIJI JINTEN HITAM (*Nigella sativa* L.) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) merupakan tanaman yang memiliki khasiat sebagai pengobatan tradisional. Kandungan kimia biji jinten hitam adalah saponin, alkaloid, tanin, flavonoid dan terpenoid. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol 96% biji jinten hitam terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ekstrak biji jinten hitam dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan air. Hasil ekstraksi dan fraksinasi dilakukan uji aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi untuk mengetahui daya hambat dan fraksi teraktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan konsentrasi 50%; 25% dan 12,5%. Metode dilusi untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum dari fraksi teraktif dengan seri pengenceran konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,562%; 0,781% dan 0,390%. Analisis statistik menggunakan ANOVA *oneway* guna mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antara sediaan uji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki daya hambat yang paling aktif dibandingkan fraksi *n*-heksana dan air yaitu 18,3 mm terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hasil uji dilusi menunjukkan aktivitas antibakteri dengan KBM 25%.

Kata kunci : antibakteri, fraksi, biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.), *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

HASTUTI, L.N., 2018 ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF FRACTION *n*-HEXANE, ETHYL ACETAT AND WATER OF 96% ETHANOL EXTRACT FROM BLACKCUMIN SEED (*Nigella sativa* L.) AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Black cumin seed (*Nigella sativa* L.) is a plant that has property as traditional medicine. Chemical content of black cumin seed is saponnins, alkaloids, tannins, flavonoids and terpenoids. This study was conducted to determine the antibacterial activity of fraction of *n*-Hexane, ethyl acetate and water from 96% ethanol extract of black cumin seed (*Nigella sativa* L.) to *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Extraction of black cumin seed is done by maseration metod using ethanol 96% solvent, then fractionated using *n*-Hexane, ethyl acetate and water solvent. The results of extraction and fractionation were tested for antibacterial activity of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 using diffusion and dilution method. The diffusion method for knowing minimum inhibitory concentration and the most active fraction of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 with concentration 50%, 25% and 12,5%. Dilution method is for knowing minimum bactericidal concentration of active fraction with concentration dilution series; 50%; 25; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,562%; 0,781% and 0,390%. ANOVA oneway is used for statistical analysis to determine whether there is significant difference between the test preparation.

The results howed that ethyl acetate fraction has the most active inhibition power compared *n*-Hexane and water fraction that 18,3 mm concentration to *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Dilution test results showed antibacterial activity with MBC 12,5%.

Keyword : antibacterial, fraction, black cumin seed (*Nigella sativa* L.), *Pseudomonas aeruginosa*.

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Berdasarkan masyarakat Indonesia sudah sejak ratusan tahun yang lalu memiliki tradisi memanfaatkan tumbuhan dari lingkungan sebagai obat tradisional. Sejak lebih dari dua puluh tahun yang lalu masyarakat dunia, tidak hanya di negara-negara Timur melainkan juga di negara-negara Barat, mulai menoleh kembali dan tertarik untuk menggunakan obat-obat alam, yang kita kenal sebagai gerakan kembali ke Alam atau *Back to Nature* (Noer dan Pratiwi 2016).

Pada pengobatan tradisional tidak jauh berbeda dalam mengobati berbagai macam penyakit, walaupun telah banyak ilmu pengetahuan yang telah maju atau berkembang terutama dalam bidang kesehatan tetapi, kurangnya pengetahuan dan informasi mengenai jenis tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat tradisional dan cara pembuatannya merupakan masalah dan kesulitan bagi masyarakat peminat obat tradisional (Tone *et al*. 2013).

Potensi antibakteri yang dimiliki jinten hitam telah menjadi perhatian dikalangan ilmiah karena peningkatan angka kejadian penyakit akibat infeksi bakteri di negara berkembang. Salah satunya adalah infeksi saluran nafas yaitu pneumonia dan infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh bakteri. Berdasarkan masalah ini, WHO mendorong agar ditemukan antibakteri jenis baru salah satunya dengan penggunaan tanaman obat atau pendekatan baru untuk mencari penanganan yang efektif terhadap infeksi bakteri Gram positif dan negatif karena dilaporkan lebih banyak terjadi resistensi antibiotik (CLSI 2013).

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* hanya patogen bila masuk kedalam daerah-daerah yang pertahanan normalnya. Kuman ini menyebabkan infeksi nosokomial, pada luka bakar akan menyerang darah sehingga menghasilkan nanah dan saluran kemih (Jawetz *el at* 2012).

Antibiotik yang sering digunakan pada infeksi *Pseudomonas aeruginosa* adalah penisilin yang dikombinasi dengan aminoglikosida, *aztreonam, imipenem, quinolon,* termasuk siprofloksasin.

Tanaman yang diperbanyak dengan biji ini digunakan dalam pengobatan untuk antivirus, antikanker, antiangiogenik, antioksidan dan peroksidasi lipid. Kandungan kimia jintan hitam antara lain asam lemak jenuh (asam palmitat) dan asam lemak tak jenuh (asam linoleat dan asam oleat). Selain itu, jinten hitam juga mengandung miristat, miristoleat, palmitoleat, margarat, stearat, linolenat, arakidat, eikosenoat, behenat dan asam lignoserat (Kemenkes 2011).

Biji jintan hitam memiliki banyak kandungan kimiawi yang bermanfaat bagi tubuh. Komposisi nutrisi diantaranya adalah Protein 21%, Karbohidrat 35%, dan Lemak 35-38%. Senyawa aktif dalam Jintan hitam adalah *Nigellone, Thymoquinone, dan Fixed oil.* Sehingga memiliki kemampuan sebagai anti-inflamasi, anti-kanker, anti-jamur, analgesik, aktifitas antidiabetik, dan antibakteria (Nor 2013).

Hasil penelitian Agustianasari (2016) menunjukkan bahwa Ekstrak etanol dan fraksi biji jinten hitam terbukti memiliki aktivitas antibakteri. KHM ekstrak sebesar 1,5% untuk *Bacillus subtilis* dan 3% untuk *Escherichia coli*. KHM fraksi *n*-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air masing-masing sebesar 0,5%, 0,25%, 0,5% untuk bakteri *Bacillus subtilis* dan 1%, 0,25%, 0,75% untuk bakteri *Escherichia coli*. Fraksi yang terbaik adalah fraksi etil asetat dengan nilai kesetaraan yaitu 1 mg fraksi etil asetat setara dengan 1,592 x 10-16 µg tetrasiklin untuk bakteri *Bacillus subtilis* dan 1 mg fraksi etilasetat setara dengan 2,524 x 10-17 µg tetrasiklin untuk bakteri *Escherichia coli*.

Berdasarkan penelitian Khalid *et al.* (2011) diketahui bahwa ekstrak metanol *N. sativa* menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan pada bakteri Gram positif dan negatif antara lain *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi*. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Bhumi (2014) diketahui bahwa efek antibakteri ekstrak jinten hitam yang mengandung zat aktif seperti *carvacol, thymoquinone,* dan *terpinene* yang terlarut dalam minyak atsiri, zat tersebut dapat meningkatkan permeabilitas membran bakteri diantaranya adalah *P. aeruginosa* dengan metode *disc diffusion* dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100% dan zona hambat terbesar sebesar 19 mm dan ekstrak etanol 96% jinten hitam memiliki zona hambat sebesar 8 mm

dengan konsentrasi sebesar 25%. Berdasarkan penelitian Wadud (2015), ekstrak biji jinten hitam memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi 1%; 1.25%; 1,5%; dan 1,75%.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi. Karena maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari serta cocok untuk ekstraksi awal (Depkes 2000). Penyari yang digunakan dalam proses ekstrak adalah etanol 96%, memiliki kelebihan karena lebih selektif, dan tidak dapat ditumbuhi oleh kapang dan mikroorganisme (Voigt 1995). Fraksinasi yang digunakan pelarut non polar, semipolar, dan polar. Pelarut *n*-Heksana adalah pelarut yang sifatnya non polar maka dapat menyari senyawa kimia yang non polar misalnya terpenoid. Pelarut semipolar digunakan etil asetat untuk melarutkan senyawa semipolar misalnya alkaloid. Air sebagai pelarut polar untuk melarutkan senyawa polar misalnya tanin, flavonoid dan saponin.

Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum, daerah hambatan jernih yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri yang diperiksa. Keuntungan dari metode dilusi yaitu lebih teliti, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dapat ditentukan, lebih mudah dan praktis, serta memungkinkan adanya hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah obat tertentu yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme yang di uji (Jawetz *et al* 2012).

Berdasarkan latar belakang di atas perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dengan pemisahan komponen senyawa berdasarkan polaritasnya secara fraksinasi sehingga diketahui fraksi teraktif yang mempunyai daya hambat maupun daya bunuh terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka dapat di rumuskan masalah yang akan diselesaikan yaitu :

Pertama, apakah ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853?

Kedua, dari ketiga fraksi atau ekstrak etanol 96% biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.), tersebut manakah yang teraktif dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853?

Ketiga, berapakah (Konsentrasi Bunuh Minimum) KBM dan (Konsentrasi Hambat Minimum) KHM dari fraksi teraktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui :

Pertama, untuk mengetahui ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air dari biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27583.

Kedua, untuk mengetahui ketiga fraksi atau ekstrak etanol 96% biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.), tersebut manakah yang teraktif dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ketiga, untuk mengetahui (Konsentrasi Bunuh Minimum) KBM dan (Konsentrasi Hambat Minimum) KHM dari fraksi yang paling teraktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi masyarakat sebagai obat tradisional dan dapat menambah ilmu pengetahuan bagi masyarakat untuk mengatasi masalah penyakit infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.)

1. Sistematika tanaman

Klasifikasi secara lengkap tanaman jinten hitam adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Class : Dicotyledoneae
Ordo : Ranunculales
Famili : Ranunculaceae
Genus : Nigella
Spesies : *Nigella sativa* (Rostika, 2012).

2. Nama umum/ dagang

Tanaman jinten hitam memiliki nama daerah : jinten ireng (Jawa), kalonji (India), Haba-ul-sauda (Arab), black cumin (Inggris) (Anonim.2000 dan Gillani Anwar-ul Hassan dkk.2004).

3. Deskripsi Tanaman

Jinten hitam berasal dari Asia Barat. Tumbuh baik secara spontan pada kisaran suhu 5-25°C dan pH tanah 5,8. Tanaman yang disebut "black cumin" ini berperawakan terna semusim. Batang bulat berwarna hijau tua, tinggi dapat mencapai 30cm. Daun tunggal, helaian berbagai jelas tampak seperti garis, berwarna hijau tua. Bunga tunggal di ujung batang, mahkota berwarna putih. Buah bumbung dengan 3-7 ruang biji, setiap ruang berisi banyak biji. Biji berbentuk bulat telur, bulat telur memanjang sampai segitiga, berwarna hitam (Kemenkes 2011).

4. Khasiat jinten hitam

Diuretik, karminatif, kencing batu, infeksi saluran kemih, sakit gigi, bengkak karena peradangan, kelelahan, cacingan, masalah kulit seperti jerawat, haid, menambah ASI pada wanita menyusui, meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Khasiat lainnya adalah mengurangi berat badan dan lingkar perut,

menurunkan tekanan darah,gula darah puasa, trigiliserida dan kolesterol HDL, asam urat, hipoglikemik (Al-Hader *et al.*, 1993).

5. Kandungan kimia

Biji jinten antara lain mengandung minyak atsiri: thymoquinone 25-50, p-cymene dan α-pinene, carvacrol, anetol, dan α-terpineol. Minyak lemak: asam eososianat 0,5%, asam linoleat sekitar 60%, asam linolenat 0,3%, asam oleat sekitar 25%, asam palmiat 0,3% dan asam stearat 3%. Kandungan lainnya: alkaloid, flavonoid, saponin, steroid (Agustianasari, 2016).

5.1. Alkaloid. Alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom N, biasanya dalam gabungan sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid biasanya berbentuk Kristal, hanya sedikit yang berupa cairan, dan dapat dideteksi dengan pereaksi Dragendrof (Nita Rochani 2009 *dalam* 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 & Kurniawan 2014).

5.2. Flavonoid. Senyawa flavonoid diturunkan dari unit C_6-C_3 (fenil propana) yang bersumber dari asam sikimat (via fenilanalin) unit C6 yang diturunkan dari jalur poliketida. Fragmen poliketida disusun dari tiga molekul malonil-KoA, yang bergabung dengan unit C_6-C_3 (sebagai KoA tioester) untuk membentuk unit awal trikedia. Flavonoid yang berasal dari biosintesis gabungan terdiri atas unit-unit yang diturunkan dari asam sikimat dan jalur poliketida. Sifat fisika dan kimia senyawa flavonoid antara lain adalah larut dalam air, sedangkan dalam bentuk glisida yang termetilasi larut dalam eter. Senyawa glikosida maupun aglikon, senyawa flavonoid tidak dapat larut dalam petroleum eter. Dari tumbuhan, glikosida dapat ditarik dengan pelarut organik yang bersifat polar (Heinrich *et al.* 2010).

5.3. Saponin. Saponin adalah glikosida yang banyak terdapat dalam tanaman, dicirikan dengan rasa pahit, berbusa, dan bersifat hemolisis terdapat pada sel darah merah. Saponin sangat toksik bagi ikan dan hewan air lainnya

tetapi efeknya terhadap hewan yang lebih tinggi bervariasi. Saponin ini berperan dalam aktivitas antibakteri (Zuhud *et al.* 2001).

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

5.4. Steroid. Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung siklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Dahulu sering digunakan sebagai hormone kelamin asam empedu, dll. Tetapi pada tahun-tahun terakhir ini makin banyak senyawa steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan (Harborne 2006, Robinson 1995). Mekanisme steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom (Madduluri 2013).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah di keringkan. Simplisia dibagi menjadi 3 macam yaitu, simplisia nabati, simplisia hewani, simplisia mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman dengan tingkat kehalusan tertentu. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, atau zat yang dihasilkan oleh hewan yang belum diolah berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia yang belum berupa zat kimia murni (Depkes 1985).

2. Pengeringan

Pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah di tumbuhi kapang dan bakteri, menghentikan aktivitas

enzim yang bisa menguraikan lebih lanjut kandungan zat aktif, memudahkan dalam hal pengelolaan proses selanjutnya. Pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan alat pengering. Saat pengeringan yang diperhatikan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara, waktu pengeringan dan luas permukaan bahan, sehingga simplisia tidak mudah rusak dan kandungan kimia yang berkhasiat tidak berubah karena proses fermentasi (Gunawan & Mulyani 2004).

Pengeringan secara alamiah dapat juga dilakukan dengan panas sinar matahari langsung. Cara ini dilakukan untuk mengeringkan bagian tanaman yang relatif keras seperti kayu, biji dan simplisia dengan kandungan senyawa aktif yang relatif stabil apabila terkena panas.

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi merupakan 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 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 dipilh 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

Metode maserasi (maserasi : mengairi, melunakkan) merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara serbuk simplisia direndam dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut akan adanya

perbedaan konsentrasi. Cairan penyari yang digunakan bisa berupa air, air-etanol atau pelarut lain.

Maserasi dilakukan dengan cara masukkan satu bagian serbuk kering simplisia ke dalam maserator, tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi ulangi proses penyarian sekurang kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (Farmakope Herbal Indonesia 2011).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu golongan utama yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Pemisahan jumlah dan jenisnya menjadi fraksi yang berbeda, mula mula ekstrak kental difraksinasi berturut turut dengan larutan penyari yang berbeda beda polaritasnya. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari pelarut kurang polar, dan yang terakhir disari dengan pelarut polar (Harbone 2006).

4. Pelarut

Pelarut adalah cairan yang digunakan untuk ekstraksi. Pemilihan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi dari bahan obat tertentu berdasarkan daya larut yang aktif, zat yang tidak aktif serta yang tidak diinginkan tergantung preparat yang digunakan (Ansel 1989). Etanol 96% merupakan suatu larutan penyari yang mudah diperoleh, stabil fisik dan kimia, selektif, tidak beracun, bereaksi netral, absorbsinya baik, tidak mempengaruhi zat yang berkhasiat, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan (Depkes 1986). Etanol 96% Dapat digunakan untuk menarik senyawa flavonid dan dapat diguanakan untukmengilangkan pengotor yaitu pada asam amino, protein, dan mineral (Fardhani 2014). Etanol tidak menyebabkan pembengkakan membran sel,

dapat memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut, dapat dihasilkan suatu bahan aktif yang optimal dimana bahan pengotor hanya dalam skala kecil turut dalam cairan pengektraksi (Voigt 1995).

n-Heksana 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 alcohol, benzene, kloroform dan eter. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-Heksana yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti terpenoid, triterpenoid, sterol, dan fenil propanoid (Tiwari *et al*., 2011).

Etil asetat merupakan pelarut semi polar, mudah menguap dan mudah terbakar, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup dan terlindung dari panas. Etil asetat merupakan cairan jenih tidak berwarna pada suhu kamar dengan bau khas seperti buah, larut dalam 15 bagian air bercampur etanol dan eter. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut ini adalah alkaloid. Etil asetat dapat juga melarutkan senyawa senyawa fenolik seperti: fenol, asam fenolat, fenil propanoid, dan antrakuinon (Harbone 2006).

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

D. Media

1. Pengertian

Media adalah tempat jaringan untuk tumbuh dan mengambil nutrisi yang mengandung kehidupan jaringan. Media tumbuh menyediakan berbagai bahan yang diperlukan jaringan untuk hidup dan memperbanyak diri. Mikroba dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik, didalam media diperlukan persyaratan tertentu, yaitu media harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba. Media harus mempunyai tekanan

osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba. Media harus dalam keadaan steril artinya sebelum ditanami mikroba yang dimaksud, tidak ditumbuhi mikroba lain (Abdurahman 2008).

2. Macam-macam media

Menurut konsistensinya media dapat dibedakan menjadi medium cair, medium padat dan medium setengah padat. Pertama, medium cair seperti kaldu nutrient atau kaldu glukosa dapat digunakan untuk berbagai keperluan seperti perbiakan organisme dalam jumlah besar, penelaahan fermentasi dan berbagai macam uji. Kedua, medium padat, dapat ditambahkan bahan pemadat kedalam medium kaldu. Biasanya digunakan untuk mengamati penampilan atau morfologi koloni dan mengisolasi biakan murni. Ketiga, medium setengah padat, digunakan untuk menguji ada tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi. Medium setengah padat mengandung gelatin ataupun agar agar namun konsentrasi lebih kecil dari pada medium padat (Hadioetomo 1985).

E. Sterilisasi

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, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar-X, sinar α, sinar gamma dan sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin. Sterilisasi secara mekanik yaitu penggunaan saringan atau filter untuk bahan yang akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi (Darmandi 2008). Bahan atau peralatan yang dipergunakan di dalam mikrobiologi harus dalam keadaan steril, artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu atau merusak media atapun mengganggu kehidupan dan proses yang sedang dikerjakan (Suriawiria 2005).

Media yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan *autoclav* pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan *beaker glass* disterilkan dengan oven pada suhu 170°C - 180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum

ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin (Denyer 2004).

F. Siprofloksasin

1. Mekanisme kerja siprofloksasin

Antibiotik golongan fluorokuinolon merupakan obat bakterisida yang kuat terhadap bermacam-macam mikroorganisme. Target antibiotik siprofloksasin adalah DNA ginase bakteri dan topoisomerase IV. Topoisomerase IV adalah target primer untuk sejumlah bakteri gram-positif. Siprofloksasin menghambat gulunan (supercoiling) DNA yang diperantai oleh girase pada konsentrasi yang berhubungan dengan kerja antibakteri efektifnya. Mutasi gyrA adalah dapat memberikan resistensi terhadap obat ini. Topoisomerase IV memisahkan molekul DNA tertaut silang yang dihasilkan dari replikasi DNA dan juga merupakan target dari siprofloksasin (Goodman & Gilman 2010).

2. Efek samping siprofloksasin

Mual ringan, muntah, gangguan abdominal, diare dan kolitis jarang terjadi, sakit kepala ringan, pening, halusinasi, delirium, dan seizure sangat jarang terjadi, ruam, reaksi fotosensitivitas, leukopenia, eosinifilia (Goodman & Gilman 2010).

3. Resistensi siprofloksasin

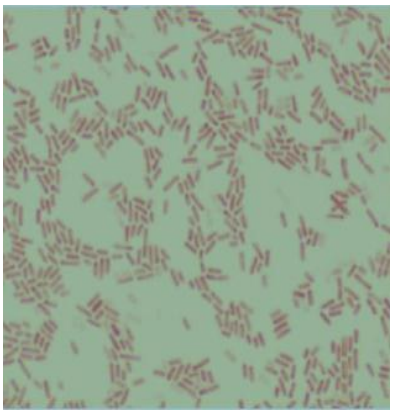
Resistensi terhadap kuinolon dapat berkembang melalui mutasi dalam gen kromosom bakteri yang mengkode DNA girase atau topoisomerase IV atau melalui transpor aktif obat keluar dari bakteri. Tidak ada mekanisme penginaktivasi kuinolon yang telah teridentifikasi. Sensitivitas telah menurun, khususnya pada *Pseudomonas* dan *Stafilokokus*. Sensitivitas fluorokuinolon juga menurun pada *Salmonella, Neisseria gonorrhoeae,* dan *Streptococcus pneumoniae* (Goodman & Gilman 2010).

4. Dosis

Siprofoksasin digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram-negatif, seperti *Escherichia coli, P.mirabillis, klebsiella sp, shigella sp, enterobacter* dan *Pseudomonas aeroginosa*, serta bakteri Gram positif tertentu, seperti *Stapylococcus sp*, dan *streptococcus sp*. Dosis oral untuk infeksi saluran

seni dan saluran napas : 250-500 mg 2 dd, selama 7 hari. Untuk infeksi saluran cerna : 500 mg 1 dd, selama 7 hari (Siswandono & Soekardjo 2008).

G. Bakteri Uji



Gambar 1. Pewarnaan Gram bakteri *Pseudomonas aeruginosa*
(sumber : Brooks,2010. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology)

1. Sistematika *Pseudomonas aeruginosa*

Sistematika bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dalam taksonomi sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Gammaproteobacteria
Order : Pseudomonadales
Family : Pseudomonadaceae
Genus : Pseudomonas
Species : *Pseudomonas aeruginosa* (Brook *el al.* 2001).

2. Morfologi dan Identifikasi

Pseudomonas aeruginosa termasuk dalam Gram negatif, bergerak aktif, yang mempunyai flagel polar, ada juga yang mempunyai 2-3 flagel dan berukuran 0,5-1,0 µm x 3,0-4,0 µm. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni bulat licin dan berwarna hijau fluoresensi, menghasilkan banyak pigmen dan yang terkenal adalah pyocyanin dan fluorescin. Pyocyanin merupakan pigmen Phenazin warna hijau kebiruan larut dalam air dan kloroform sedangkan flourescin merupakan

pigmen warna kuning kehijauan larut dalam air tetapi tidak larut dalam kloroform. Pada pertumbuhan lebih lanjut pigmen mengalami oksidasi menjadi cokelat kekuningan. Pyocyanin hanya dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa.* Hidup aerob di tanah dan air, terdapat dalam sampah, udara, kadang pada luka, menimbulkan nanah yang kebiru-biruan (Syarurachman 2001).

P. aeruginosa tumbuh dengan baik pada suhu 37-42° C; kemampuannya untuk tumbuh pada suhu 42° C membantu membedakannya dari spesies *Pseudomonas* lain dari group fluoresens. Bakeri *Pseudomonas aeruginosa bersifat* oksidase-positif dan tidak meragikan karbohidrat, tetapi banyak strain mengoksidasi glukosa. Identifikasi *P. aeruginosa* biasanya berdasarkan morfologi koloni, sifat oksidase positif, adanya pigmen yang khas dan pertumbuhan pada suhu 42° C. Untuk membedakan *Pseudomonas aeruginosa* dari *Pseudomonas* yang lain berdasarkan aktivitas biokimiawinya dibutuhkan berbagai substrat (Jawetz *el al.* 2012).

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram negatif batang, tidak meragi laktosa, dapat hidup dilingkungan seperti tempat-tempat basah, pada instrumen-instrumen kedokteran rumah sakit, kamar mandi, tempat tidur, tinja dan kulit manusia dapat menyebabkan infeksi nesokonial (Mudihardi *el al*. 2005).

3. Toksin *Pseudomonas aeruginosa*

Galur menghasilkan eksotoksin A, yang menyebabkan nekrosis jaringan dan letal bagi hewan jika diinjeksikan dalam bentuk yang telah dimurnikan. Toksin tersebut menghambat sintesis protein melalui mekanisme kerja yang identik dengan mekanisme kerja toksin difteri, meskipun struktur kedua toksin tersebut tidak identik. Antitoksin untuk eksotoksin A ditemukan dalam beberapa serum manusia, termasuk serum pasien yang telah pulih dari infeksi berat *P.aeruginosa* (Jawetz *et al*. 2012).

4. Patogenesis

P. aeruginosa menjadi patogenik hanya jika mencapai daerah yang tidak memiliki pertahanan normal, misalnya membran mukosa dan kulit yang terluka oleh cedera jaringan langsung; saat penggunaan kateter urin atau intravena; atau jika terdapat neutropenia, seperti pada kemoterapi kanker. Bakteri melekat dan

membentuk koloni pada membran mukosa atau kulit, menginvasi secara lokal, dan menyebabkan penyakit sistemik. Proses tadi dibantu oleh pili, enzim, dan toksin yang telah disebutkan sebelumnya. Lipopolisakarida berperan langsung dalam menyebabkan demam, syok, oliguria, leukositosis dan leukopenia, koagulasi intravaskular diseminata, dan sindrom gawat napas dewasa.

P. aeruginosa dan *pseudomonas* lain resisten terhadap banyak obat antimikroba sehingga bakteri ini menjadi dominan dan penting ketika bakteri flora normal yang lebih sensitif tertekan (Jawetz *et al*. 2012).

5. Mekanisme antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan. Dalam penggolongannya antibakteri dikenal dengan antiseptik dan antibiotik. Berbeda dengan antibiotik yang tidak merugikan sel sel jaringan manusia, daya kerja antiseptik tidak membedakan antara mikrororaganisme dan jaringan tubuh.Antibiotik adalah zat zat kimia yang dihasilkan oleh bakteri dan fungi.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi dalam 5 kelompok yaitu: mengganggu metabolisme dinding sel bakteri, menghambat sintesis dinding sel bakteri, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, menghambat sintesis protein sel bakteri, menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri (Odianti 2010).

5.1. Penghambatan metabolisme sel bakteri. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional, sehingga kebutuhan asam folat tidak terpenuhi hal ini bisa menyebabkan bakteri mati (Odianti 2010). Contoh antibiotik sulfonamide dan trimethoprim (Bakung 2014).

5.2. Penghambatan sintesis dinding sel. Dinding sel bakteri terdiri atas polipeptidiglikan. Polipeptidiglikan yaitu suatu komplek polimer glikopeptida. Salah satu kerja antibakteri adalah menghambat sintesis dinding sel. Struktur dinding sel dapat rusak dengan cara menghambat pembentukannya tau

mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Odianti 2010). Contoh antibiotik penisilin sefalosporin karbapenem, manobaktam, vancomysin (Bakung 2014).

5.3. Perubahan permeabilitas membran sel bakteri. Selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat zat yang terlarut lainnya. Salah satu kerja antibakteri adalah mengubah tegangan permukaan sehingga merusak permeabilitas selektif dari membran sel mikroba. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain alin (Odianti 2010). Contoh antibiotik polimiksin, amfoterisin B, gramisidin, nistatin (Bakung 2014).

5.4. Penghambatan sintesis protein sel bakteri. Untuk kehidupannya, bakteri perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein, akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel mikroba (Odianti 2010). Contoh antibiotik adalah aminoglikosida, makrolida, tetrasiklin, streptogamin, kloramfenikol (Bakung 2014)

5.5. Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri. DNA, RNA dan protein memegang peranan penting dalam kehidupan normal sel. Salah satu kerja antibakteri yang lain adalah mekanisme berikatan dengan enzim polymerase RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut (Odianti 2010). Contoh antibiotik yang mengganggu sintesis DNA adalah metronidasol, kuinolon, novobiosin. Contoh yang mengganggu RNA seperti rifampisin (Bakung 2014).

6. Metode difusi

Metode difusi merupakan metode yang paling sering digunakan. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa warna jernih yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap mikroba yang diperiksa (Jawetz *et al*. 2007). Metode ini dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu metode silinder, metode lubang/sumur, dan

metode cakram kertas/*disc diffusion*. Metode sumur yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi mikroba. Kemudian lubang diinjeksikan dengan ekstrak yang akan diuji. Kemudian di inkubasi, lalu pertumbuhan mikroba diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Kusmayati & Agustini 2007).

Disc diffusion dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (clear zone) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan mikroba oleh suatu senyawa antimikroba dalam ekstrak (Hermawan *et al*. 2007). Faktor-faktor yang mempengaruhi metode difusi agar yaitu ketebalan medium agar, jumlah inokulum, komposisi media agar, suhu inkubasi, waktu inkubasi dan pH (Rostinawati 2009). Keuntungan metode difusi adalah lebih mudah, cepat, tidak membutuhkan alat dan bahan yang banyak, sehingga efektif sebagai pembanding. Kelemahan dari metode difusi adalah tidak dapat menentukan apakah suatu obat (agen kemoterapi) sebagai bakterisidal dan bukan hanya bakteriostatik (Jawezt *et al.* 1986).

7. Metode dilusi

Metode dilusi berguna untuk mencari KHM dan KBM dengan mengetahui kadar obat terendah yang dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan mikroba (Bonang & Koeswardono 1982). Prinsip metode dilusi adalah senyawa antimikroba diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi. Kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi mikroba uji dalam media cair. Kemudian diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan mikroba, yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Larutan uji senyawa antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa ada pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM, selanjutnya KHM tersebut dikultur ulang pada media agar tanpa penambahan mikroba uji ataupun senyawa antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media agar yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan jamur setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi 2008).

Keuntungan metode dilusi adalah diketahui KHM dan KBM. Bahan uji pada metode dilusi cair bahan uji lebih mudah berinteraksi dengan bakteri karena suspensi bakteri tersebar hingga metode ini lebih peka. Kekurangan metode ini

adalah memerlukan waktu relatif lebih lama, tidak praktis (Jawezt *et al.* 1986) dan sampel yang digunakan ini harus jernih, karena bila keruh dapat mempersulit pengamatan. Prinsip dari metode dilusi adalah penghambatan pertumbuhan mikroba dalam pembenihan cair oleh suatu obat yang dicampurkan dalam pembenihan yang dapat membunuh mikroba secara optimum dan tidak menetralkan obat yang digunakan (Bonang & Koeswardono 1982).

H. Landasan Teori

Kandungan kimia jinten hitam antara lain asam lemak jenuh (asam palmitat) dan asam lemak tak jenuh (asam linoleat dan asam oleat). Selain itu, jinten hitam juga mengandung miristat, miristoleat, palmitoleat, margarat, stearat, linolenat, arakidat, eikosenoat, behenat dan asam lignoserat (Kemenkes 2011).

Penelitian lain menyebutkan pula kandungan biji jinten hitam di antaranya alkaloid, flavonoid, saponin, steroid (Agustianasari 2016).

Penelitian sebelumnya diketahui bahwa efek antibakteri ekstrak jinten hitam yang mengandung zat aktif seperti *carvacol, thymoquinone,* dan *terpinene* yang terlarut dalam minyak atsiri, zat tersebut dapat meningkatkan permeabilitas membran bakteri diantaranya adalah *P. aeruginosa* dengan metode *disc diffusion* dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100% dan zona hambat terbesar sebesar 19 mm dan ekstrak etanol 96% jinten hitam memiliki zona hambat sebesar 8 mm dengan konsentrasi sebesar 25% (Bhumi 2014).

Penelitian lain tentang efek dari pemberian ekstrak *Nigella sativa* L. terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan hasil yang cukup baik. Pemberian ekstrak jintan hitam yang menggunakan pelarut metanol dengan konsentrasi 2% pada *Pseudomonas aeruginosa* membentuk zona hambat 21 mm (Arici 2005).

Metode maserasi (*macerace* : mengairi, melunakkan) merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara serbuk simplisia direndam dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut akan adanya

perbedaan konsentrasi. Cairan penyari yang digunakan bisa berupa air, air-etanol atau pelarut lain (Farmakope Herbal Indonesia, 2011).

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu golongan utama yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Pemisahan jumlah dan jenisnya menjadi fraksi yang berbeda, mula mula ekstrak kental difraksinasi berturut turut dengan larutan penyari yang berbeda beda polaritasnya. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari pelarut kurang polar, dan yang terakhir disari dengan pelarut polar (Harborne 2006).

Pelarut yang digunakan adalah *n*-Heksana, etil asetat dan air. *n*-Heksana merupakan pelarut non polar berupa cairan jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar. *n*-Heksana dapat melarutkan senyawa senyawa non polar antara lain lemak, golongan triterpenoid, terpenoid dan steroid (Munawaroh & Handayani 2010).

Etil asetat merupakan pelarut semi polar, mudah menguap dan mudah terbakar, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup dan terlindung dari panas. Etil asetat merupakan cairan jenih tidak berwarna pada suhu kamar dengan bau khas seperti buah, larut dalam 15 bagian air bercampur etanol dan eter. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut ini adalah alkaloid. Etil asetat dapat juga melarutkan senyawa senyawa fenolik seperti: fenol, asam fenolat, fenil propanoid, dan antrakuinon (Harbone 2006). Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, menyebabkan kematian sel tersebut.

Air merupakan senyawa polar yang stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah. Selain itu, air juga mudah diperoleh dan harganya terjangkau senyawa yang dapat larut dalam air adalah tannin, saponin, flavonoid, garam alkaloid, minyak menguap, pati, protein lender lilin, lemak, pectin zat warna dan asam organik (Depkes 1986). Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri dan mampu menghambat motilitas bakteri (Darsana 2012). Saponin mempunyai sifat seperti

sabun, merupakan senyawa aktif permukaan yang kuat, saponin bekerja sebagai antimikroba (Santosa 2005).

Pseudomonas aeruginosa termasuk dalam Gram negatif, bergerak aktif, yang mempunyai flagel polar, ada juga yang mempunyai 2-3 flagel dan berukuran 0,5-1,0 µm x 3,0-4,0 µm. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni bulat licin dan berwarna hijau fluoresensi, menghasilkan banyak pigmen dan yang terkenal adalah pyocyanin dan fluorescin. Pyocyanin merupakan pigmen Phenazin warna hijau kebiruan larut dalam air dan kloroform sedangkan flourescin merupakan pigmen warna kuning kehijauan larut dalam air tetapi tidak larut dalam kloroform. Pada pertumbuhan lebih lanjut pigmen mengalami oksidasi menjadi cokelat kekuningan. Pyocyanin hanya dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa.* Hidup aerob di tanah dan air, terdapat dalam sampah, udara, kadang pada luka, menimbulkan nanah yang kebiru-biruan (Syarurachman 2001)

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* hanya patogen bila masuk kedalam daerah-daerah yang pertahanan normalnya tidak ada atau bila berperan dalam infeksi campuran. Kuman ini menyebabkan infeksi luka dan luka bakar, membentuk nanah yang berwarna biru-hijau; meningitis, bila dimasukkan dengan punksi lumbal dan infeksi saluran air kemih, bila dimasusukkan oleh kateter dan alat-alat atau dalam larutan irigasi. Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi dan metode dilusi (Jawetz *et al.* 2012).

I. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada, dapat disusun suatu hipotesis dalam penelitian ini yaitu:

Pertama, ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-Heksana, etil asetat, dan air dari biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, dari ketiga fraksi dan ekstrak etanol 96% biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang mempunyai aktivitas teraktif dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah etil asetat.

BAB III
METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah biji jinten hitam yang diperoleh dari Desa Sidomulyo, Kec. Batu, Malang, Jawa Timur pada bulan November 2017. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji jinten hitam. Mempunyai ciri-ciri berbentuk bulat telur, bulat telur memanjang sampai segitiga, berwarna hitam.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian yang pertama adalah ekstrak etanol 96% dan fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air dari biji jinten hitam.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 96% serta fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja di ubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung.

Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak, fraksi *n*-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol biji jinten hitam dalam berbagai konsentrasi.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, kondisi laboratorium (meliputi inkas, alat

dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian ini.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri yang dapat dilihat dari pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada media uji.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, biji jinten hitam adalah biji dari tanaman jinten hitam yang diperoleh dari Desa Sidomulyo, Kec. Batu, Malang, Jawa Timur.

Kedua, serbuk biji jinten hitam adalah biji jinten hitam yang diambil kemudian dicuci, dikeringkan dalam alat pengering (oven) pada suhu 50°C, setelah kering di giling dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak biji jinten hitam adalah hasil ekstraksi serbuk biji jinten hitam dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi.

Keempat, fraksi *n*-Heksana adalah ekstrak biji jinten hitam yang ditambah air kemudian difraksinasi menggunakan pelarut *n*-Heksana.

Kelima, fraksi etil asetat didapat dari residu ekstrak biji jinten hitam dengan fraksi *n*-Heksana yang kemudian difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah residu fraksi etil asetat dari biji jinten hitam.

Ketujuh, bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang di peroleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi adalah metode yang digunakan untuk mengukur zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk. Dengan berbagai konsentrasi 50%; 25%; dan 12,5%. Kontrol negatif adalah DMSO 1% dan antibiotik siprofloksasin sebagai kontrol positif. Metode dilusi adalah metode yang digunakan untuk menentukan KHM dan KBM dengan membuat berbagai seri konsentrasi dengan cara penapisan sampai konsentrasi akhir. Dengan berbagai konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,5625%; 0,78125%; 0,390625%. Kontrol negatif adalah ekstrak/ fraksi dan kontrol positif suspensi bakteri.

C. Bahan dan Alat

1. Alat

1.1. Alat untuk pembuatan dan analisis serbuk simplisia. Alat yang digunakan pembuatan serbuk simplisia adalah timbangan, oven, blender, ayakan no. 40, dan *sterling-bidwell*.

1.2. Alat maserasi. Alat yang digunakan untuk maserasi adalah botol berwarna coklat, gelas ukur, kain flanel, kertas saring, *vaccum rotary evaporator* dan *waterbath.*

1.3. Alat uji aktivitas antibakteri. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah ose platina, cawan petri, inkas, tabung reaksi, pipet tetes, lampu spiritus, otoklaf, inkubator, kaca objek, mikroskop dan penggaris.

1.4. Alat identifikasi kandungan senyawa. Alat yang digunakan untuk identifikasi senyawa adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, penjepit tabung, lampu spiritus, corong kaca, *beaker glass* dan gelas ukur. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, *n*-Heksana, etil asetat, aquadest steril, HCl, $FeCl_3$, $H2SO_4$ pekat, Mg.

2. Bahan

2.1. Bahan utama. Bahn utama yangdinakan adalah biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.*)* yang diperoleh dari desa Sidomulyo, Kecamatan Batu, Malang, Jawa Timur.

2.2. Bahan kimia. Bahan yang digunakan pelarut *n*-Heksana, etil asetat, etanol 70%, aquadestilata, HCl 2N, $FeCl_3$ 1%, larutan Wagner, asam sulfat pekat, asam asetat pekat, serbuk Mg, NaCl, (Gram A) cat kristal violet, (Gram B) larutan lugol iodine, (Gram D) safranin, larutan DMSO 1%, disc antibiotik siprofloksasin.

2.3. Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2.4. Media. Media ini digunakan adalah PSA (*Pseudomonas Selective Agar*), BHI (*Brain Heart Infusion*), MHA (*Mueller Hinton Agar*). media untuk uji biokimia yaitu KIA (*Kligler Iron Agar*), SIM (*Sulfide Indol Motility*), LIA (*Lysine Iron Agar*), Citrat Agar.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama penelitian adalah determinasi tanaman yang dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Determinasi ini bertujuan untuk mengidentifikasi biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dengan menetapkan kebenaran sampel biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) berdasarkan ciri-ciri morfologi tanaman.

2. Pembuatan serbuk biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

Pembuatan serbuk biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) adalah dengan cara biji jinten hitam dicuci bersih pada air yang mengalir agar bebas dari kotoran dan debu, kemudian dikeringkan dan dioven pada suhu ± 40°C. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga dapat mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri serta untuk mengurangi bekerjanya enzim dan perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu serta memudahkan dalam proses penyerbukan. Setelah kering segera diserbuk dengan mesin penyerbuk kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga didapatkan serbuk biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen. Penyerbukan ini bertujuan agar luas permukaan partikel bahan yang kontak dengan larutan penyaring dapat diperluas sehingga penyariannya efektif.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk biji jinten hitam

Penetapan susut pengeringan serbuk biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) menggunakan alat *Moisture balance.* Suhu atau temperatur diatur yaitu sebesar 115°C dan waktu pengeringan secara manual yaitu 13 menit kemudian dimasukkan neraca timbang dengan skala 0,00 maka sampel serbuk biji jinten hitam sebanyak 2 gram dimasukkan. Kemudian ditunggu sampai alat berbunyi, menandakan hasil analisa telah selesai. Kadar lembab memenuhi syarat dimana kadar lembab suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%.

4. Pembuatan ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

Pembuatan ekstrak dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 b/v. Serbuk biji jinten hitam sebanyak 500 gram lalu dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat, dengan ditambahkan

pelarut etanol 96% sebanyak 3750 ml. Ekstrak dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojog berulang-ulang. Maserasi yang didapatkan selama 5 hari diperas dengan kain flanel dan disaring dengan kertas saring. Residu kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 1250 ml dimasukkan kedalam botol dengan sesekali diaduk dan dibiarkan selama 2 hari. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental biji jinten hitam.

5. Fraksinasi ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

Ekstrak kental yang diperoleh dari hasil ekstraksi biji jinten hitam selanjutnya difraksinasi cair-cair dengan menggunakan 75 ml etanol:air dan 75 ml *n*-Heksana sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah sampai membentuk dua lapisan cairan yang terpisah secara nyata. Sari yang didapat dari fraksi *n*-Heksana dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 40°C. Hasil fraksinasi ini disebut fraksi *n*-Heksana. Lapisan sisa fraksinasi *n*-Heksana yang diperoleh difraksinasi kembali dengan 75 ml etil asetat sebanyak tiga kali menggunakan corong pisah sampai membentuk dua lapisan cairan yang terpisah secara nyata. Sari yang didapat dari fraksi etil asetat dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 40°C. Hasil fraksinasi ini disebut fraksi etil asetat. Sisa hasil fraksinasi *n*-Heksana dan etil asetat adalah fraksi air dipekatkan dengan waterbath.

6. Pengujian kandungan senyawa kimia serbuk, ekstrak dan fraksi biji jinten hitam

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam biji jinten hitam. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, dan steroid dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi, Surakarta.

6.1. Flavonoid. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram dicampurkan dengan aquadestilata dan dipanaskan, kemudian disaring sebanyak dua kali. Setelah itu, ditambahkan 0,1 mg dan 1 ml etanol 96% lalu diberikan 1 sampai 2 tetes HCl 2N. Adanya perubahan warna menjadi warna merah tua dan jingga selama 3 menit menunjukkan bahwa sampel tersebut positif memiliki kandungan flavonoid (Depkes 2000).

6.2. Alkaloid. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan aquadestilata dan dipanaskan. Setelah itu disaring sebanyak dua kali, dan ditambahkan larutan HCl 2N sebanyak 1 sampai 2 tetes. Selanjutnya ditetesi pereaksi Wagner. Adanya perubahan warna dan terdapat endapan coklat maka positif memiliki kandungan alkaloid (Resmi 2011).

6.3. Saponin. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram ditambahkan dengan aquadestilata, kemudian dipanaskan selama 2 sampai 3 menit. Setelah dipanaskan tunggu sampai dingin lalu kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil menandakan adanya kandungan saponin (Ramyasheree *et al*.2012).

6.4. Tanin. Sebanyak 1 mg bahan uji dilarutkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 1 mL larutan $FeCl_3$ 10%, lalu dikocok sampai homogen. Biru kehitaman atau hitam kehijauan (Robinson 1995).

6.5. Steroid. Sejumlah ekstrak ditambahkan 1 ml larutan asam asetat anhidrat dan 1 ml larutan H_2SO_4 pekat. Munculnya warna hijau sampai biru menunjukkan adanya steroid.

7. Penetapan persen rendemen

Persen rendemen diperoleh dari menimbang hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dan dikalikan 100%

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

8. Tes bebas etanol ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

Ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) bebas etanol dilakukan dan dibuktikan di Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Ekstrak pekat yang telah jadi dapat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat lalu dipanaskan. Uji positif bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 1978).

9. Sterilisasi

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-30 menit. Gelas ukur dan beaker galass disterilkan dengan oven pada suhu 160°C selama 60 menit. Ose platina

disterilkan dengan pemanas api langsung sterilisasi inkas menggunakan formalin (Suriawiria 1985).

10. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

10.1. Isolasi pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA). Dengan cawan tuang, bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasi media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Penampakan membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen berwarna kehijauan (Jawetz *el al.* 2007).

10.2. Identifikasi biokimia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

10.2.1 Media SIM. Cara identifikasi dengan biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji sulfida untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, yaitu tidak terdapat warna hitam pada media, uji indol yaitu terbentuk warna merah pada bagian atasnya setelah ditambahkan dengan reagen Erlich, uji motilitas yaitu pertumbuhan bakteri yang menyebar pada media.

10.2.2 Media KIA. Cara identifikasi dengan biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Hasil K/KS^{-} untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah bagian lereng berwarna merah ditulis K, bagian dasar berwarna merah ditulis K, sulfida negatif yaitu tidak terbentuk warna hitam pada media yang ditulis S^{-}.

10.2.3 Media LIA. Cara identifikasi dengan biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil K/KS^{-} untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yaitu lereng akan berwarna ungu ditulis K, dasar berwarna ungu ditulis K, dan sulfida negatif yaitu tidak terbentuknya warna hitam pada media ditulis S^{-}.

10.2.4 Media Citrat. Cara identifikasi yaitu dengan biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif (+) untuk *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853 yaitu media berwarna hijau berubah menjadi warna biru (Power & Mc Cuen 1988).

10.3. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode pengecatan. Identifikasi yang dilakukan selanjutnya adalah pengecatan Gram. Bakteri yang dicurigai *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada pengamatan koloni, diambil satu ose kemudian dioleskan pada objek glass. Smear pada objek glass kemudian ditetesi dengan Gram A (larutan kristal violet) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram B *(lugol's iodine)* ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram C (etanol 96%) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram D (safranin) diamkan ± 1 menit kemudian dibilas. Objek glass yang telah dilakukan pengecatan dilihat di mikroskop (Mulyadi 2011). Hasil bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 digolongkan dalam bakteri Gram negatif dengan warna sel merah.

11. Pengujian daya antibakteri dengan metode difusi

Metode difusi adalah dengan menggunakan *blank disc* (kertas cakram kosong) diameter 6 mm yang sudah dijenuhkan dengan larutan stok. Kapas lidi yang steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi suspensi bakteri yang telah sesuai dengan standar *Mc* Farland 0,5 kemudian kapas lidi yang telah mengandung bakteri dioleskan pada media MHA dengan metode perataan *Spread Plate Method*. Setelah olesan bakteri mengering atau berdifusi. Pada media tersebut dibuat 6 bagian kertas cakram. Selanjutnya kertas cakram yang telah dijenuhkan dari semua konsentrasi diletakkan pada media MHA yang sudah diolesi bakteri dan diletakkan sesuai dengan bagian masing-masing, cakram 1 diisi ekstrak, cakram 2 diisi fraksi *n*-heksana, cakram 3 diisi fraksi etil asetat, cakram 4 diisi fraksi air, cakram 5 diisi larutan DMSO 1% sebagai kontrol negatif dan cakram 6 diisi disc antibiotik siprofloxsasin sebagai kontrol positif. Konsentrasi ekstrak dan fraksi masing-masing 50%, 25% dan 12,5%. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati diameter terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Zona yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram menandakan adanya daya hambat

terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

12. Pengujian daya antibakteri dengan metode dilusi

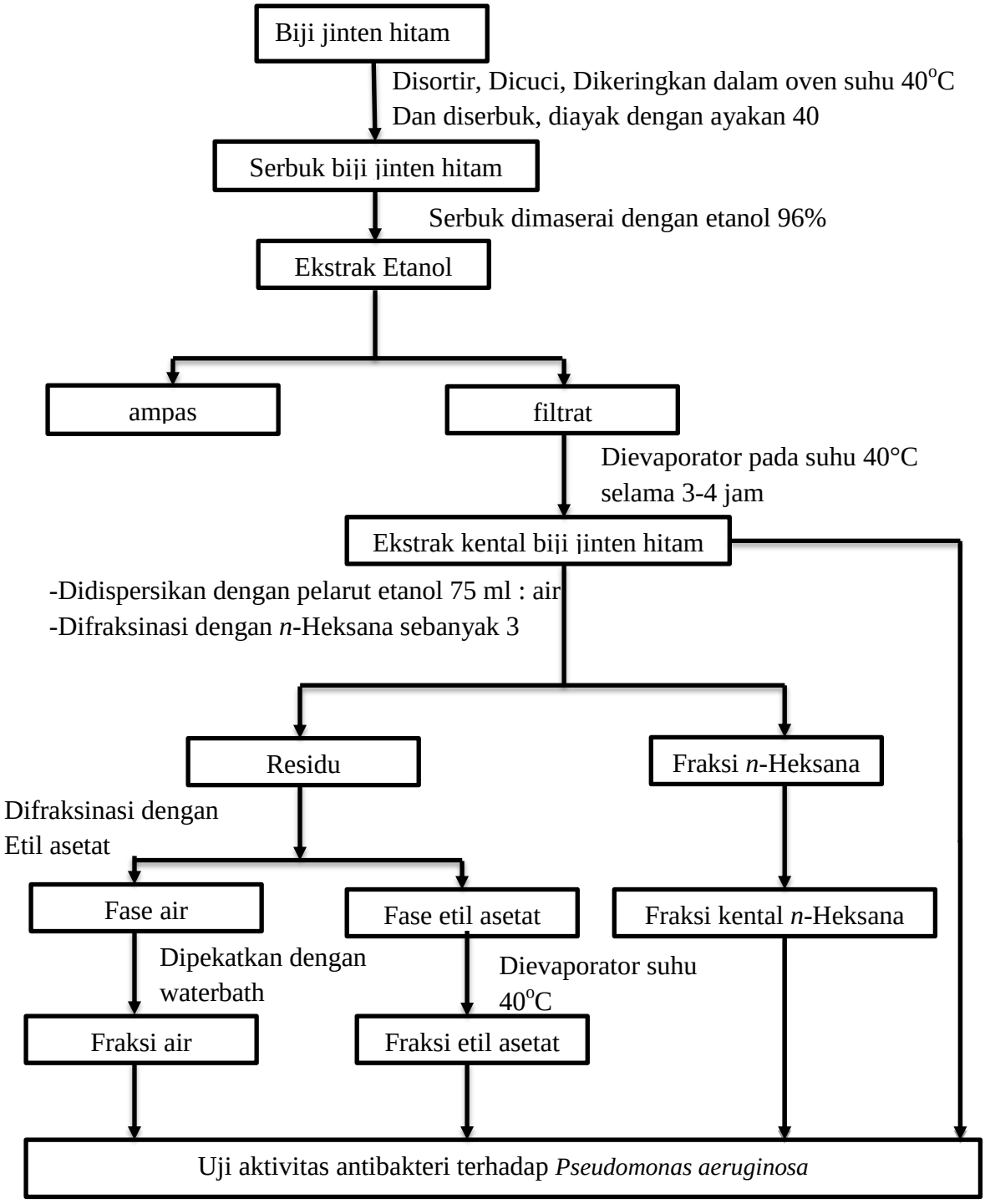
Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 10 tabung steril. Pembuatan larutan stok fraksi teraktif menggunakan pelarut DMSO 1%, sedangkan fraksi air dilarutkan dalam aquadest steril, masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa konsentrasi pengenceran yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,562%; 0,781%; 0,390%. Kontrol negatif adalah ekstrak/ fraksi dan kontrol positif suspensi bakteri.

Medium BHI dimasukkan 0,5 ml ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptis, tabung pertama ditambahkan 0.5 ml fraksi lalu dikocok kemudian dari tabung pertama ditambahkan 0,5 ml dimasukkan kedalam tabung kedua, dan dari tabung kedua diambil 0,5 ml dimasukkan kedalam tabung ketiga dan begitu seterusnya sampai tabung keenam. Suspensi bakteri dalam medium BHI dimasukkan kedalam tiap-tiap tabung uji sebanyak 0,5 ml. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhanya. 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 menginokulasi sediaan dari tabung uji pada media *Pseudomonas Selektive Agar* (PSA) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

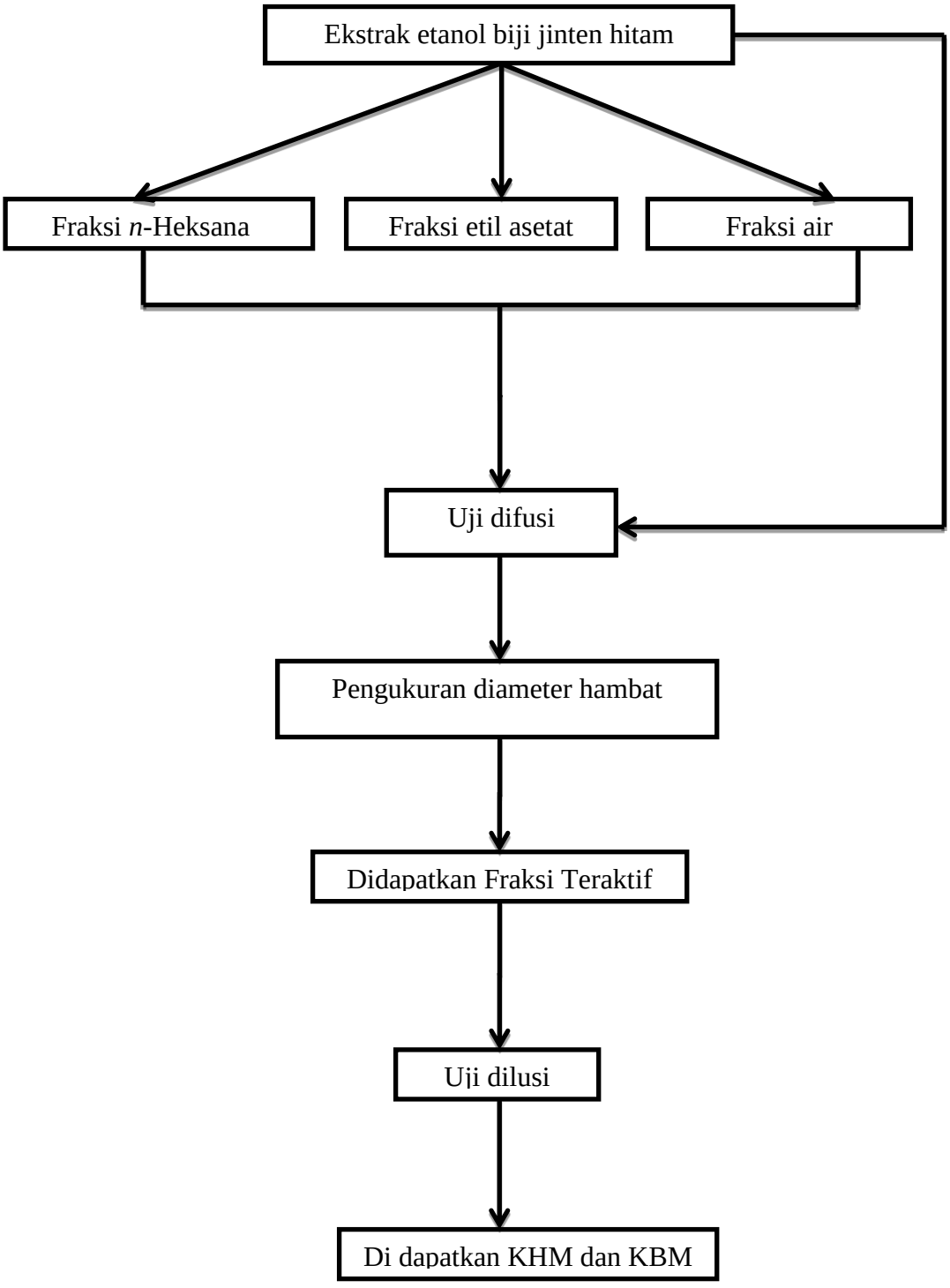
E. Analisis Data

Hasil uji aktivitas bakteri ekstrak biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan metode difusi dan dilusi yang dinyatakan dengan nilai zona hambat yang terbentuk. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan Kolmogorof-Smirnov, jika terdistribusi secara normal kemudian dilanjutkan dengan analisis menggunakan statistik metode One Way Anova.

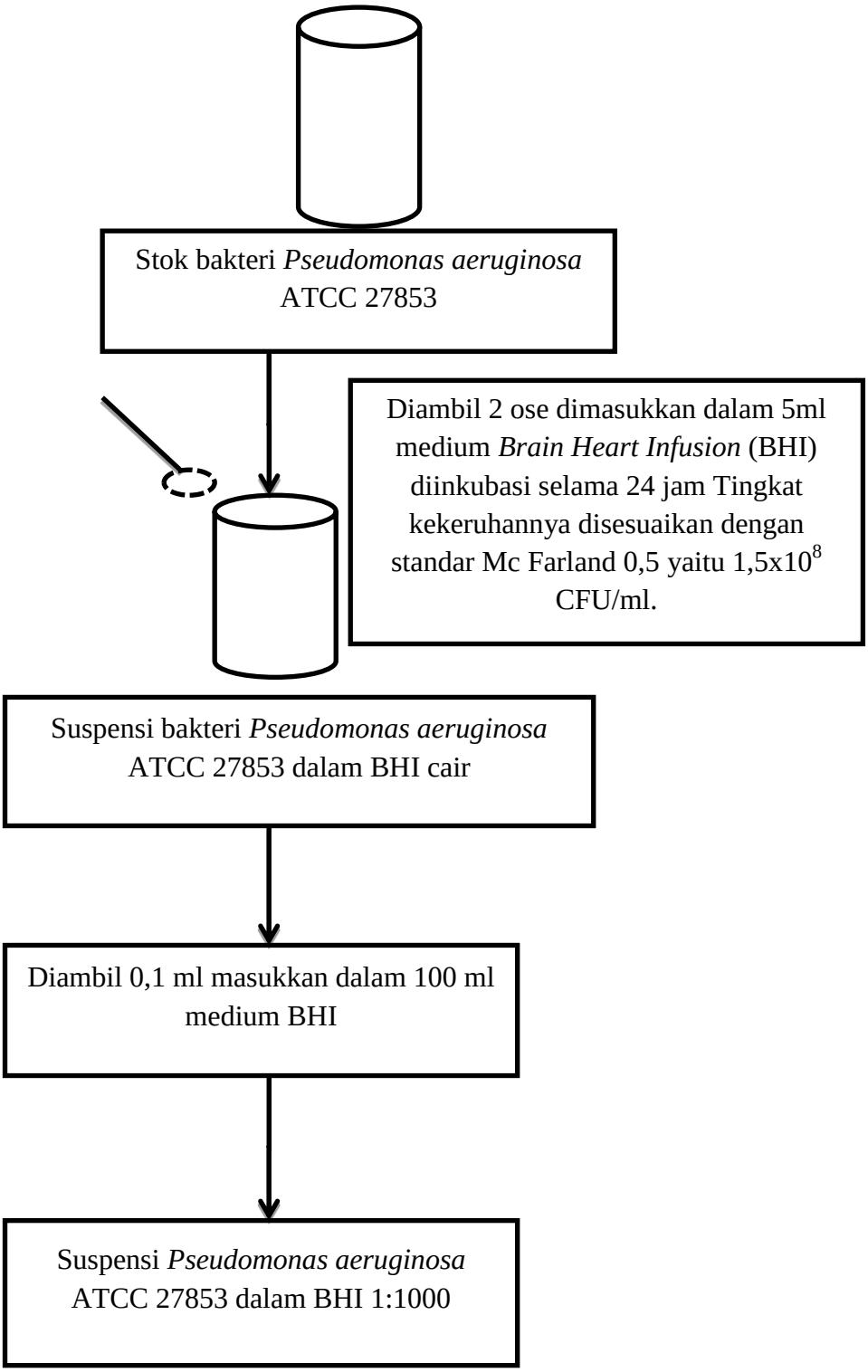
F. Skema Jalannya Penelitian



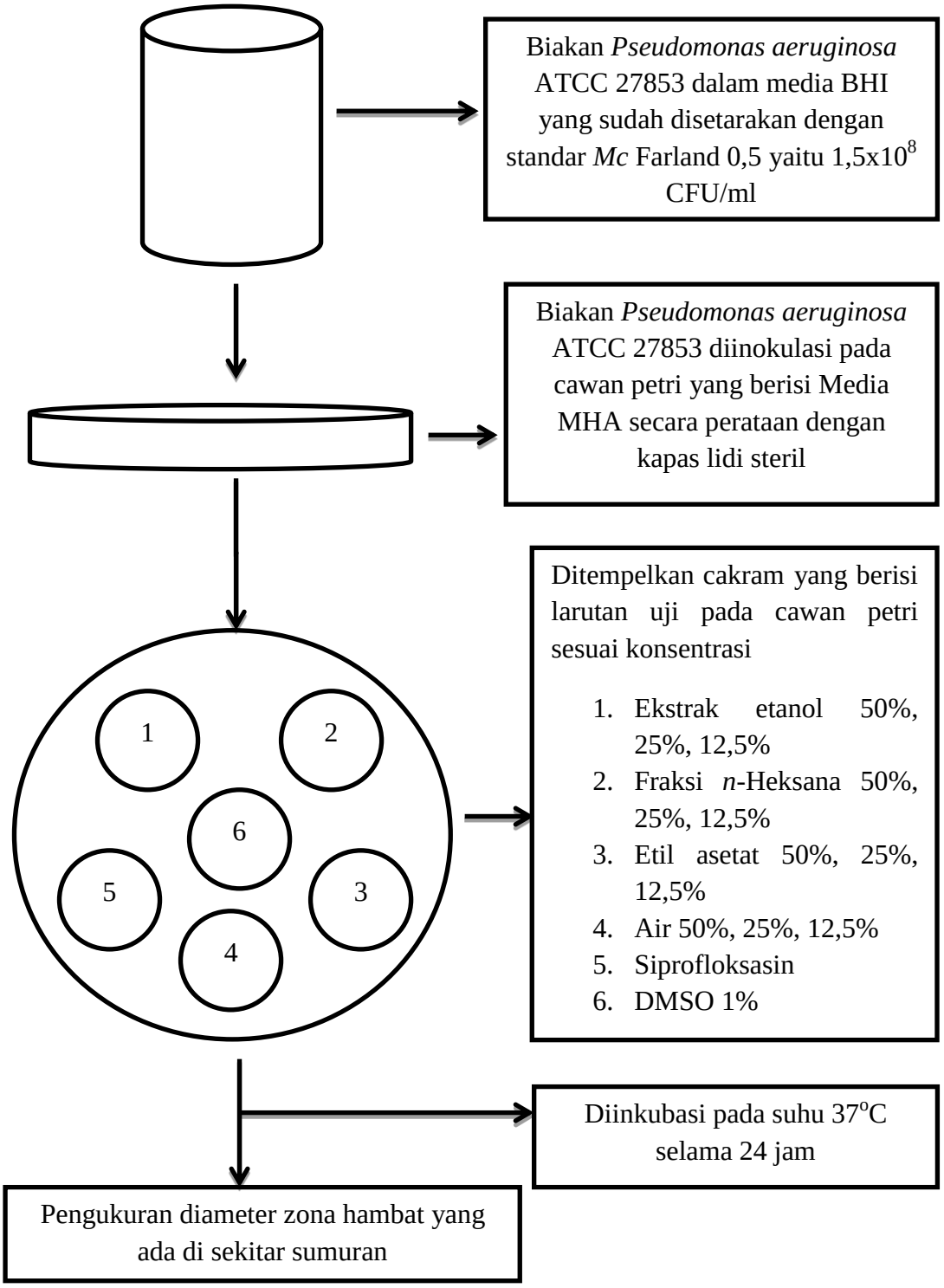
Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi jintan hitam (*Nigella sativa* L.)



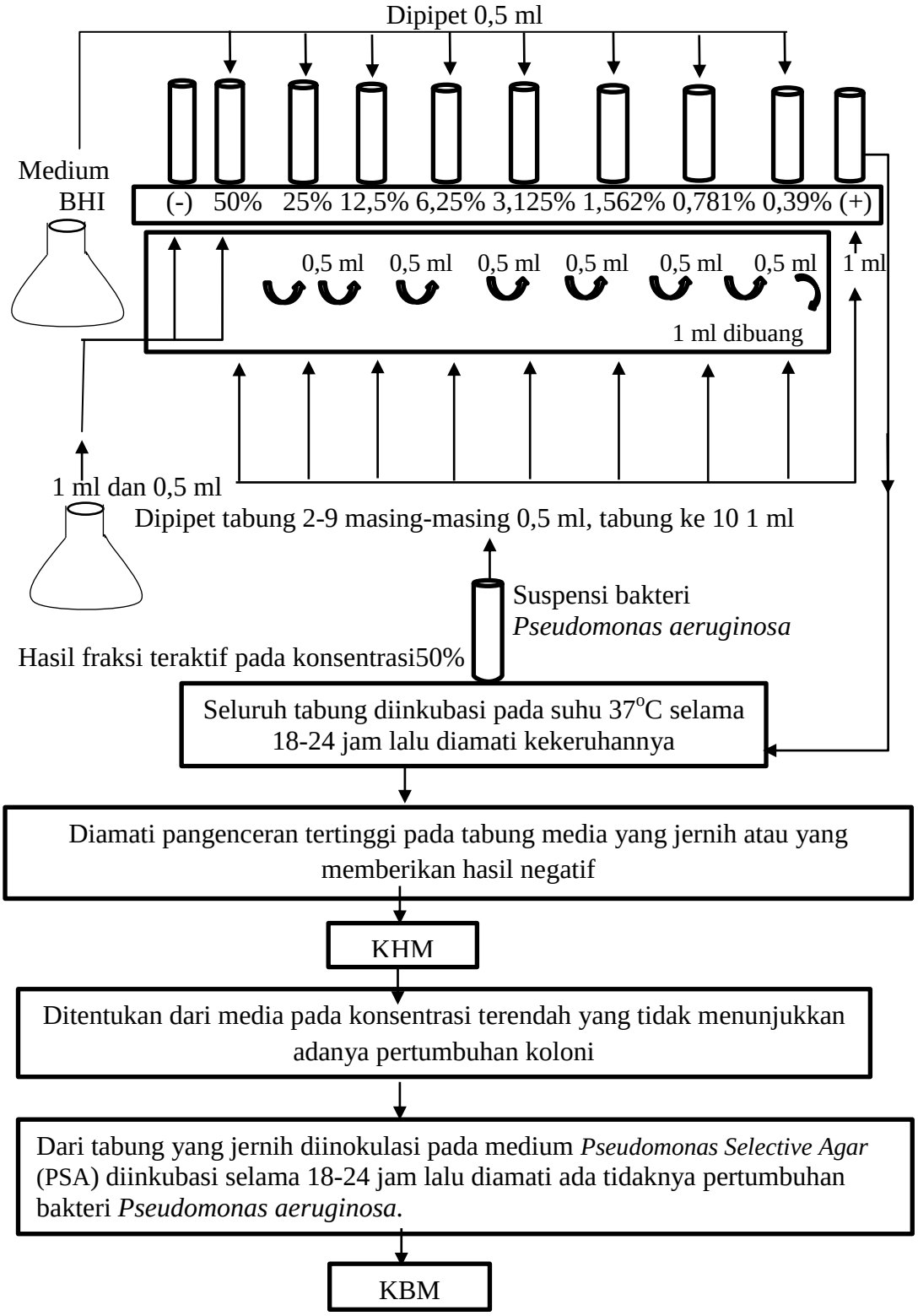
Gambar 3. Skema jalannya penelitian



Gambar 4. Bagan kerja pembuatan suspensi bakteri dengan perbandingan 1:1000



Gambar 5. Uji aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Gambar 6. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif dari ekstrak etanol biji jinten hitam terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode dilusi.

BAB IV
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Hasil determinasi biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

Determinasi biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dilakukan di Universitas Sebelas Maret Surakarta. Berdasarkan hasil determinasi dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini benar-benar biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.). Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan digunakan sebagai objek penelitian dengan cara mencocokkan ciri-ciri dan morfologi tanaman yang tercantum dalam literatur, untuk menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan dan menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Hasil dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pembuatan serbuk biji jinten hitam

Biji jinten hitam yang telah dicuci bersih dengan air mengalir sampai terbebas dari debu. Biji jinten hitam yang sudah bersih kemudian ditimbang dan diangin-anginkan lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C. Proses pengeringan mengurangi kadar air untuk mencegah terjadinya pembusukkan yang disebabkan oleh jamur dan bakteri, mencegah perubahan kimiawi yang dapat menurunkan mutu serbuk, serta mempermudah pembuatan serbuk.

Biji jinten hitam yang sudah dikeringkan kemudian dibuat serbuk dengan tujuan penarikan dapat berlangsung semaksimal mungkin. Karena semakin kecil partikel maka permukaan serbuk yang bersentuhan dengan cairan penyari akan semakin luas sehingga penyarian dapat berlangsung efektif. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah biji jinten hitam dapat dilihat pada tabel 1.

Biji jinten hitam yang sudah kering kemudian digiling lalu diayak dengan ayakan no 40 agar diperoleh derajat kehalusan yang sama sehingga ekstraksi dapat berjalan lebih optimal. Bobot basah sebanyak 1500 gram diperoleh bobot kering sebesar 1200 gram. Persentase rata-rata bobot kering terhadap bobot basah buah pare sebesar 80% b/b. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 11.

Tabel 1. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah biji jinten hitam

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
1500	1200	80

3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk biji jinten hitam

Penetapan kadar lembab dilakukan untuk memperoleh prosentase kelembaban yang terdapat dalam serbuk yang akan diekstraksi. Kadar kelembaban yang terlalu tinggi dapat menyebabkan enzim-enzim dalam simplisia menjadi aktif dan merubah komposisi kimia sehingga kualitas simplisia menurun. Tabel 1 menunjukkan hasil penetapan kadar air dalam serbuk biji jinten hitam.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk biji jinten hitam (Nigella sativa L.)

Replikasi	Berat (gram)	Kandungan lembab serbuk (%)
1	2,0	7,0
2	2,0	7,5
3	2,0	7,0
Rata-rata		7,16

Rata- rata hasil kadar lembab biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) menggunakan alat *moisture balance* yaitu 7,16%, sehingga memenuhi syarat karena tidak lebih dari 10%. Penetapan kadar air dari simplisia perlu dilakukan mengingat air merupakan media tumbuhnya bakteri dan mikroorganisme yang lain yang dapat merusak simplisia.

4. Hasil pembuatan ekstrak biji jinten hitam

Pembuatan ekstrak dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 b/v. Serbuk biji jinten hitam sebanyak 1000 gram lalu dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat, dengan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 7500 ml. Ekstrak dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojog berulang-ulang. Maserasi yang didapatkan selama 5 hari diperas dengan kain flanel dan disaring dengan kertas saring. Residu kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 2500 ml dimasukkan kedalam botol dengan sesekali diaduk dan dibiarkan selama 2 hari. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental biji jinten hitam.

Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

Bahan sampel	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen ekstrak (b/b%)
1000	47,22	4,72

Berdasarkan tabel 2, persentase rendemen ekstrak maserasi biji jinten hitam yang diperoleh sebanyak 4,72% merupakan hasil yang bagus. Organoleptis ekstrak warna hitam kecoklatan, bentuk kental, rasa pahit, bau khas biji jinten hitam. Ekstrak tersebut kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut *n*-Heksana, etil asetat dan air. Hasil perhitungan ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dapat dilihat pada lampiran 13.

5. Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi biji jinten hitam

Ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) dilakukan tes bebas etanol dengan melakukan uji esterifikasi alkohol. Hasil tes bebas etanol ekstrak biji jinten hitam dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 4. Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

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

Hasil tes bebas etanol pada tabel 3 menunjukkan bahwa ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) tersebut sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 96 % yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol. Hasil test bebas etanol adalah untuk membuktikan bahwa ekstrak biji jinten sudah tidak mengandung etanol. Hasil tes bebas etanol dapat dilihat pada Lampiran 6.

6. Fraksinasi

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan kandungan yang satu dari yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawanya yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa – senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, senyawa yang bersifat semipolar akan masuk ke pelarut semipolar begitu pula senyawa yang bersifat nonpolar akan masuk ke pelarut nonpolar (Tiwari *et al.* 2011). Fraksinasi ekstrak etanol biji jinten hitam dilakukan dengan menggunakan pelarut yang berbeda berdasarkan perbedaan polaritasnya. Pelarut yang digunakan adalah *n*-heksan, etil asetat, dan air. *n*-heksana adalah pelarut yang bersifat nonpolar, etil asetat adalah pelarut semipolar, sedangkan air adalah pelarut polar. Hasil fraksinasi ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) seperti pada Tabel 4.

Tabel 5. Persentase rendemen hasil fraksinasi biji jinten hitam *(Nigella sativa* L.)

Bobot Ekstrak (g)	Pelarut	Berat fraksi (g)	Persentase Rendemen (%)
40	*n*-Heksana	5,76	14,4
	Etil asetat	5,57	13,92
	air	18,25	45,62

Perhitungan persentase rendemen fraksi *n*-Heksana biji jinten hitam didapat yaitu 14,4%, persentase rendemen fraksi etil asetat sebesar 13,92% sedangkan persentase rendemen fraksi air sebesar 45,62%. Perhitungan rendemen fraksi dapat dilihat pada Lampiran 14.

Hasil fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibandingkan fraksi yang lain karena mungkin sebagian besar senyawa dalam biji jinten hitam bersifat polar. Rendemen setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol biji jinten hitam berbeda. Hasil fraksinasi biji jinten hitam dapat dilihat pada Lampiran 6.

7. Hasil uji kandungan kimia serbuk dan ekstrak biji jinten hitam

Uji kandungan kimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder yang tersari di dalam ekstrak etanol 96% biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.), sehingga dapat diketahui metabolit sekunder yang berpotensi memiliki aktivitas antibakteri.

Tabel 6. Hasil identifkasi kandungan kimia serbuk dan ektrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

Kandungan kimia	Hasil		Pustaka	Hasil	
	Serbuk	Ekstrak		Serbuk	Ekstrak
Alkaloid	Endapan jingga	Endapan Jingga	Dragendrof : endapan berwarna jingga Mayer : endapan berwarna kuning (Tiwari dkk. 2011)	+	+
Flavonoid	Jingga atau kemerahan	kemerahan	Terbentuk larutan berwarna merah (Depkes RI 2011)	+	+
Saponin	Buih tetap setinggi 1cm	Buih tetap setinggi 1cm	Terbentuk buih yang mantap ditandai dengan buih setinggi 1 sampai 10 cm (Tiwari dkk 2011)	+	+
Tanin	Hitam kehijauan	Hitam kehijauan	warna hijau, merah, ungu, biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan, hijau biru menunjukkan adanya Polifenolat (Robinson 1995, Kinghorn 2006)	+	+
Steroid/ Sterol	Cincin Coklat kehijauan	Cincin Coklat kehijauan	cincin coklat kemerahan (Tiwari *et al.* 2011).	+	+

Keterangan : (+) : ada senyawa
(-) : tidak ada senyawa

Berdasarkan Tabel 5 di atas menunjukkan bahwa identifikasi yang telah dilakukan pada serbuk dan ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) mengandung senyawa kimia saponin, alkaloid, tanin, flavonoid dan steroid/terpenoid hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kandungan dari tanaman biji jinten hitam mengandung steroid, alkaloid, monoterpen, polifenolat, flavonoid dan saponin (Agustinasari *et al* 2016).

Hasil identifikasi senyawa kimia juga dilakukan pada fraksi biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang mengandung senyawa lebih sedikit dibandingkan dengan serbuk dan ekstrak dari biji jinten hitam. Hal ini dikarenakan prinsip dari fraksinasi yang memisahkan senyawa berdasarkan polaritasnya. Fraksi *n*-Heksana biji jinten hitam mengandung senyawa non polar yaitu tanin dan steroid, sedangkan fraksi etil asetat menarik senyawa semipolar yaitu flavonoid, polifenol, alkaloid, dan fraksi air mengandung senyawaa polar yaitu tanin/polifenol, flavonoid dan saponin. Hasil identifikasi kandungan kimia pada fraksi biji jinten hitam dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 7. Hasil identifkasi kandungan kimia fraksi *n*-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

Kandungan kimia	Hasil			keterangan		
	n-Heksana	Etil asetat	Air	*n*-Heksana	Etil asetat	air
Alkaloid	Mayer : Endapan hijua Dragendroff : endapan hijau tua	Mayer :ada endapan putih kekuningan Dragendroff :Jingga kecoklatan	Mayer : endapan putih kekuningan Dragendroff : Jingga	-	+	+
Flavonoid	Hijau muda	Warna merah	Warna merah bata	+	+	+
Saponin	Tidak terbentuk busa	Tidak terbentuk busa	Terbentuk busa	-	+	+
Tanin	Hijau muda	Warna coklat	Hitam	-	+	+
Steroid	Terbentuk cincin coklat	Terbentuk cincin hijau kecoklatan	Hitam	+	-	+

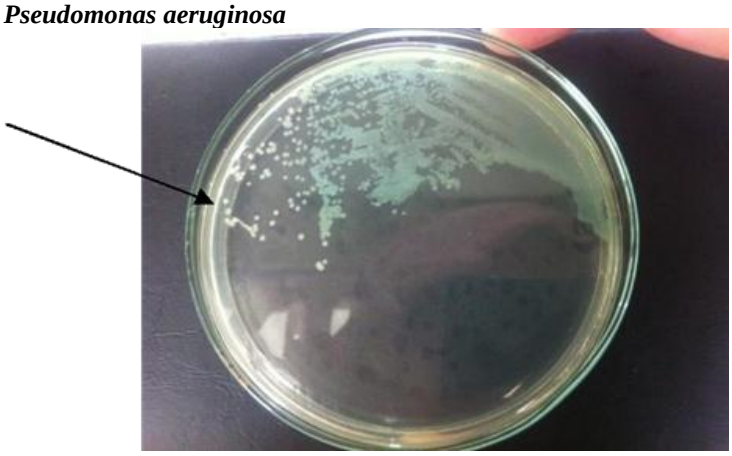
Keterangan: **(+) : ada senyawa**
(-) : tidak ada senyawa

Hasil uji identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi biji jinten hitam dapat dilihat pada Lampiran 7 dan 8.

8. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

8.1 Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara goresan. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasikan pada medium *PSA* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37^0C. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan penampakan koloni yang berwarna hijau kebiruan yang dihasilkan dari pigmen *pyocianine*, koloni berbentuk batang.

Koloni *Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 6. Hasil koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)

8.2 Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara biokimia. Hasil identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara biokimia dapat dilihat dari Tabel 7 dan Gambar 8.

Tabel 8. Hasil identifikasi uji biokimia pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Penguji	Pustaka (Volk & Wheller 1990)	Hasil
SIM	(-) (-) (+)	(-) (-) (+)
KIA	K/K S^-	K/K S^-
LIA	K/K S^-	K/K S^-
Citrat	(+)	(+)

Keterangan :

SIM	= *Sulfide Indol Motility*	A	= *Acid* (Asam)
LIA	= *Lysin Iron Agar*	K	= *Alkali* (basa)
KIA	= *Kliger Iron Agar*	S	= *Sulfide*
+	= reaksi positif	G	= Gas
-	= reaksi negatif	N	= Netral

Hasil pengujian pada media *Sulfide Indol Motility* (SIM) untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas. Pengujian dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37^0C. Hasil yang didapat adalah --+ yang artinya pada uji sulfida *Pseudomonas aeruginosa* tidak dapat mereduksi thiosulfat

sehingga tidak menghasilkan *hydrogen sulfide* sehingga media tidak berwarna hitam. Uji indol dibuktikan dengan menambahkan 3 tetes reagen *Erlich* A dan B, pada permukaan media tidak terbentuk warna merah muda yang berarti uji indol negatif, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak membentuk cincin indol karena tidak terjadi pemecahan asam amino triptopan oleh enzim triptopanase yang menjadi indol dan asam piruvat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak memakai triptopan sebagai salah satu sumber karbon sehingga tidak terjadi reaksi antara indol dan paradimetil amino bensaldehid yang akan membentuk rosindol yang berwarna merah. Uji motilitas positif yang ditunjukkan dengan penyebaran di media *Sulfide Indol Motility* (SIM) karena terlihat adanya penyebaran disekitar daerah inokulasi, hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagel.

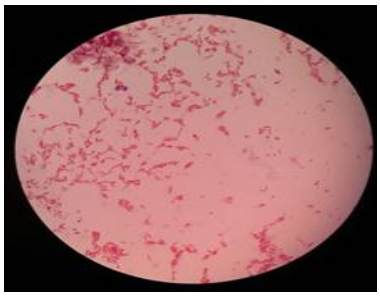
Hasil pengujian pada media *Klinger Iron Agar* (KIA) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan perbentukan sulfida. Pengujian dengan media KIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37^oC menunjukkan hasil K/K S^-. Hasil K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna merah, yang menunjukkan bahwa bakteri tidak memfermentasi glukosa dan laktosa. Hasil S^- artinya H_2S negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media, karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H_2S. H_2S akan bereaksi dengan Fe^{++} yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam. Medium KIA mengandung 1% laktosa, 0,1% glukosa dan *phenol red* sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam. Media KIA juga mengandung sodium thiosulfat yaitu susunan untuk menghasilkan H_2S.

Medium *Lysin Iron Agar* (LIA) untuk mengetahui deaminase lisin dan sulfida. Pengujian dengan LIA setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37^0C menunjukkan hasil K/K S^-. Hasil K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa sehingga berwarna ungu di seluruh media, karena warna pembenihan ini mengandung bromkresol

ungu dari warna coklat menjadi warna ungu. Hasil S^-artinya uji H_2S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA karena bakteri tidak mampu mendeselfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H_2S. H_2S akan bereaksi dengan Fe^{++} yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam.

Hasil pengujian pada media citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunkana citrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian dengan medium citrat setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37^0C menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya warna biru pada media citrat. Hal ini karena *Pseudomonas aeruginosa* mampu menggunakan citrat sebagai sumber karbon maka menyebabkan suasana menjadi basa sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru karena pada medium citrat terdapat BTB (*Bromo Thymol Blue*) yang merupakan indikator pH.

8.3 Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* metode pengecatan Gram.



Gambar 7. Hasil identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* secara mikroskopis

Pengecatan Gram bertujuan untuk mengetahui bakteri tergolong Gram positif atau Gram negatif. Hasil pengecatan Gram menunjukkan bakteri *Pseudomoans aeruginosa* termasuk Gram negatif. Dimana dinding pada bakteri Gram negatif terdapat lipopolisakarida, sehingga alkohol dapat merusak lapisan lipopolisakarida tersebut. Komplek *crystal violet – iodin* dari Cat Gram A dan B pada Gram negatif dapat tercuci dan menyebabkan sel bakteri tampak transparan, yang menyebabkan bakteri berwarna merah setelah diberi safranin yang merupakan pewarna basa berwarna merah (Pratiwi 2008). Hasil pengecatan Gram dilihat dibawa mikroskop dengan perbesaran 100 x. Hasilnya berbentuk batang,

satu – satu atau bergerombol dan berwarna merah. Gambar identifikasi bakteri berdasarkan koloni dapat dilihat pada Lampiran 5.

9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari biji jinten hitam untuk mengetahui fraksi yang teraktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan konsentrasi larutan 50%, 25% dan 12,5% serta kontrol negatif DMSO 1% dan kontrol positif siprofloksasin. Dimana siprofloksasin merupakan antibiotik golongan florokuinolon yang penting untuk terapi infeksi yang di sebabkan *Pseudomonas aeruginosa* dan memiliki mekanisme kerja dengan cara menghambat DNA girase dan topoisomerase IV yang keduanya merupakan enzim yang penting untuk replikasi DNA bakteri. Kontrol positif yang digunakan yaitu siprofloksasin dalam bentuk cakram disk 5 µg, hasil ditunjukkan dengan adanya zona bening yang ditimbulkan di sekeliling cakram siprofloksasin. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 1% hasil yang ditunjukkan tidak adanya zona bening yang terbentuk pada uji diameter zona hambat Lampiran 14.

Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Katrin *et al*. (2015) menyatakan bahwa DMSO 1% tidak memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri. Selain itu, hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Reapinam (2007) yang menyatakan bahwa hasil diameter penghambatan DMSO terhadap bakteri-bakterinya adalah nol, sehingga pelarut ini merupakan pelarut yang baik karena tidak memberikan pengaruh dalam aktivitas penghambatan bakteri.

Metode difusi pada pengujian aktivitas antibakteri dipilih karena cepat, mudah dan sederhana dalam pengerjaannya. Pengujian secara difusi menggunakan disc cakram dengan ukuran 6 mm. Masa inkubasi pengujian aktivitas antibakteri selama 18-24 jam pada suhu 37ºC, daya hambat yang terbentuk berupa warna jernih disekitar daerah disc dalam ukuran mm. Prinsip dari metode difusi ialah kapas lidi steril dimasukkan ke dalam tabung yang berisi suspensi, pembuatan suspensi bakteri uji disesuaikan dengan kekeruhan modifikasi standart *Mc farland* 0,5. Masa inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian kapas lidi tersebut di tekan-tekan pada ujung tabung dan digoreskan merata pada media MHA. Sebelumnya

disc direndam dalam larutan uji dan ditunggu hingga jenuh (± 4 jam). Lalu disc dari ekstrak etanol 96%, fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% diletakkan diatas media MHA yang telah mengandung bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan sedikit ditekan. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Depkes 1991). Diameter daerah hambat yang terbentuk ditunjukkan dengan lingkungan bening di sekitar cakram yang berisi larutan uji dan dihitung menggunakan penggaris yang dinyatakan dalam satuan mm seperti Tabel 8. (Rostiana 2007). Perhitungan konsentrasi larutan dapat dilihat pada Lampiran 9.

Tabel 9. Hasil diameter zona hambat ekstrak, fraksi *n*-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

		Diameter daya hambat (mm)			
		Replikasi			Rata – rata
Sediaan uji	Konsentrasi	1	2	3	(mm)
Ekstrak	50%	14	15	16	15±1,00
	25%	14	15	15	14,67±0,57
	12,5%	13	14	14	13,67±0,57
Fraksi *n*-Heksana	50%	10	13	10	11±1,73
	25%	11	12	10	11±1,00
	12,5%	10	10	11	10,33±0,57
Fraksi etil asetat	50%	18	19	18,5	18,3±0,5
	25%	18	18	17	17,67±0,57
	12,5%	16	17	18	17±1,00
Fraksi air	50%	11	12	13	12±1,00
	25%	12	13	10	11,67±1,52
	12,5%	11	10,5	10,5	10,67±0,57
Kontrol negatif	1%	0	0	0	0,00
Kontrol positif	5µg	28	29	28	28,3±0,57

Keterangan : K^- : (Kontrol negatif) DMSO 1%
K^+ : (Kontrol positif) Siprofloksasin

Pada Tabel 9 menunjukan daerah zona hambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada ekstrak biji jinten hitam dengan konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% berkisar antara 13–15 mm dan pengujian aktivitas fraksi etil asetat menunjukkan hambatan pertumbuahan konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% berkisar antara 17-18 mm. Pada fraksi air memiliki zona hambat pada konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% berkisar antara 10-12 mm. Sedangkan pada pengujian aktivitas

fraksi *n*-Heksana menunjukkan hambatan pertumbuahan konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% berkisar antara 10-11 mm.

Hasil pengujian diatas menunujukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air dari biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Konsentrasi 50% memiliki daya hambat paling besar terutama pada fraksi etil asetat dibandingkan dengan fraksi *n*-Heksana, etil asetat, air dan ekstrak etanol 96% ditunjukkan adanya zona jernih disekitar cakram yang tidak ditumbuhi bakteri. Hasil tersebut diduga disebabkan oleh adanya kandungan senyawa semipolar di fraksi etil asetat yang lebih optimum dibandingkan senyawa di dalam fraksi *n*-Heksana, fraksi air, dan ekstrak biji jintan hitam dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753, sehingga diduga aktivitas antibakteri yang efektif dari fraksi etil asetat adalah alkaloid, flavonoid dan steroid. Hal ini sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa senyawa kimia yang berpotensi sebagai antibakteri adalah steroid, alkaloid, tanin/polifenol, flavonoid dan saponin (Rohman 2015; Mubeen *et al.* 2012). Senyawa flavonoid merupakan golongan senyawa fenolik, yang diduga mekanisme kerjanya dengan mendenaturasi protein sel dan merusak membran sel mikroorganisme. Suatu subtansi yang dapat mendenaturasi protein dan merusak sel tanpa dapat diperbaiki lagi (*irreversible*) sehingga pertumbuhan mikroba terganggu (Rinawati 2011). Sedangkan Alkaloid dapat mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak berbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian bakteri (Poeloengan dkk 2010). Mekanisme kerja steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada lapisan liposom (Madduluri 2013). Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri ialah dapat menurunkan tegangan permukaan sehingga dapat melisiskan dinding bakteri. Sedangkan mekanisme kerja tanin sebagai antimikroba ialah berhubungan dengan kemampuan tanin dalam menginaktivasi adhesin sel mikroba (molekul yang menempel pada sel inang) Naim (2004).

Fraksi *n*-Heksana memiliki aktivitas penghambatan paling kecil dibandingkan fraksi etil asetat , air dan ekstrak etanol yang disebabkan karena pelarut tersebut hanya melarutkan sedikit senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas antimikroba dan juga disebabkan karena fraksi air yang belum terpisah, sehingga ada sebagian senyawa metabolit yang tidak terfraksi. Hal inilah yang menyebabkan adanya penghambatan yang tidak terlalu besar pada fraksi air. Sesuai dengan pernyataan bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu ekstrak maka akan semakin besar efek yang ditimbulkannya (Pelczar dan Chan 1998). Hasil penelitian Agustianasari (2016) menunjukkan bahwa fraksi yang terbaik ialah fraksi etil asetat. Namun demikian penggunaan antibiotik Siprofloksasin sebagai kontrol positif masih lebih efektif digunakan di masyarakat dibanding hasil ekstrak ataupun fraksi biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hasil difusi dapat dilihat dilampiran 8.

Analisis data pada penelitian secara difusi dianalisis menggunakan (ANOVA) *oneway* diameter zona hambat bakteri *Pseudomonas aeruuginosa* menunjukkan nilai signifikansi 0,000 (P<0,05) yang berarti terdapat perbedaan signifikansi pengaruh perlakuan yang diberikan pada bakteri uji. Anova *oneway* untuk membandingkan ekstak dan fraksi pasa setiap konsentrasi dan membandingkan hubungan besar diameter daya hambat antara ektrak etanol , fraksi *n*-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air. Hal ini menunjukkan bahwa, ekstrak, fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air biji jinten hitam dengan konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% memberikan aktivitas yang menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Hubungan diameter daya hambat dari ekstrak etanol, fraksi *n*-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air, dapat dilihat pada tabel tukey test. Tabel tersebut menjelaskan bahwa ada tanda * pada Mean Diffence, maka perbedaan tersebut signifikan dengan maksud memiliki perbedaan diameter hambat aktivitas antibakteri, sedangkan tidak ada tanda * maka perbedaan signifikan dengan maksud tidak memiliki perbedaan diameter hambat aktivitas antibakteri. Yang dapat dilihat pada lampiran 20. Tabel Homogeneous Subsets untuk mencari group

atau subset mana saja yang mempunyai perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Terlihat empat belas sediaan uji terbagi dalam 9 subset.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa fraksi etil asetat yang memiliki aktivitas antibakteri lebih optimal dalam membunuh bakteri *Pseudomonas aeruuginosa* jika dibandingkan dengan ekstrak, fraksi *n*-Heksana dan fraksi air karena kemungkinan dalam fraksi etil asetat, zat yang tersari didalamnya yaitu alkaloid, flavonoid dan steroid.

10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi

Metode ini dipilih karena selain dapat menentukan ada tidaknya kemampuan antibakteri pada fraksi teraktif yaitu fraksi etil asetat dari biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang dapat menentukan besar Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) terhadap bakteri uji. Metode dilusi bermanfaat untuk mengetahui dosis minimal dari obat yang bersifat antibakteri (Pratiwi 2008) Pembuatan larutan uji fraksi etil asetat dilarutkan dengan DMSO 1% dengan seri konsentrasi yang dibuat untuk pengujian antibakteri adalah 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,5625%; 0,78125% dan 0,390625%. Kontrol positif berupa bakteri uji dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kontrol negatif berupa fraksi etil asetat.

Aktivitas antibakteri tidak dapat terlihat karena sampelyang digunakan dalam penelitian ini keruh sehingga mempersulit pengamatan KHM. Sehingga dilanjutkan dengan penggoresan pada media selektif. KBM yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri fraksi etil asetat yang dapat dilihat dari pengujian fraksi etil asetat terhadap bakteri uji pada tabung yang kemudian diinokulasi pada media selektif yaitu *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) dalam cawan petri. KBM ditentukan pada medium PSA dengan konsentrasi minimum yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara dilusi seperti Tabel 10.

Tabel 10. Hasil aktivitas antibakteri fraksi teraktif biji jintan hitam terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Konsentrasi (%)	Fraksi Etil Asetat		
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III
Kontrol negatif (-)	-	-	-
50%	-	-	-
25%	-	-	-
12,5%	+	+	+
6,25%	+	+	+
3,125%	+	+	+
1,5625%	+	+	+
0,78125%	+	+	+
0,390625%	+	+	+
Kontrol positif (+)	+	+	+

Keterangan :
(-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri
(+) : Ada pertumbuhan bakteri
Kontrol (-) : Fraksi etil asetat
Kontrol (+) : Suspensi bakteri

Fraksi etil asetat biji jinten hitam terbukti memiliki daya hambat minimum terhadap aktivitas antibakteri. Hal ini mungkin disebabkan interaksi antara senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan KBM terbaik 25%. Hal ini dapat disebabkan karena senyawa-senyawa antibakteri yang terkandung dalam biji jinten hitam bersifat semipolar, sehingga terlarut pada fraksi etil asetat. Frasi dapat melarutkan flavonoid, sehingga diduga efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Flavonoid memiliki aktivitas antibakteri dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki kembali (Prayudhani *et al*. 2012) .

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Pseaudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara dilusi dapat dilihat pada Lampiran 10

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian kajian aktivitas antibakteri fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-Heksana, etil asetat, dan air dari biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, dari ketiga fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri paling aktif dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah fraksi etil asetat dengan konsentrasi yang paling efektif yaitu pada konsentrasi 50% dengan diameter zona hambat kuat sebesar 18,3 mm.

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi air dari ekstrak etanol biji jinten hitam sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yaitu pada konsentrasi 25%.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan kandungan senyawa-senyawa kimia murni teraktif dengan metode isolasi senyawa.

Kedua, dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap bakteri yang lain dan dengan metode ekstraksi lain.

Ketiga, perlu dilakukan uji dilusi pada semua ekstrak etanol, fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air biji jinten hitam (Nigella sativa L.) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

DAFTAR PUSTAKA

[Depkes Kesehatan RI]. 1979. *Farmakope Indonesia.* Jilid 3. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

[Depkes Kesehatan RI]. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

[Depkes Kesehatan RI]. 1986. *Sediaan Galenik.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

[Depkes Kesehatan RI]. 1987. *Analisis Obat Tradisional.* Jilid 1. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

[Depkes RI] Depertemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Farmakofe Indonesia*. Jakarta: Depertemen Kesehatan Republik Indonesia.

[Depkes Kesehatan RI]. 2008. *Pengelolaan Pasca Panen Tanaman Obat*. Balai Penelitian Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Alamsyah, Kurniawan H. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut (J.G.agardh) dari Perairan Pulau Pajang Jepara Terhadap Bakteri *Escherichia Coli* dan *Staphylococcus* epidermis. *Jurnal Of Marine Research* 3:60-78).

Abdurrahman D.2008. *Biologi Kelompok Pertanian dan Kesehatan*, Bandung: Grafindo Media Pratama.

Arici M, Sagdic O, Gecgel U. Antibacterial effect of Turkish black cumin (*Nigella sativa* L.) oils [Skripsi]. Gasas y Aceites. 2018; 56.

Arisandi LJ. 2016. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air dari daun talas (*Colocasia esculenta* L.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. [Skripsi] Surakarta: Universitas Setia Budi.

Bakung CT.2014. Studi Penggunaan Antibiotik Pada Pasien ISPA Rawat Jalan Di Rumah Sakit Professor dr Aloei Saboe Kota Gorontalo [Thesis]. Universitas Negeri Gorontalo.

Bhumi LS. 2014. Uji aktivitas ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* [Skripsi]. Universitas Islam Negri Syarif Hidayatullah. Jakarta.

Bonang G, Koeswardono. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: PT Gramedia. Hlm 9,77-78, 176-191.

Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2004. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology twenty second edition Lange Medical Books/McGraw-hill. Medical publishing division.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 22. *Perfomance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing*; 23rd *informational Supplement* [22 Desember 2017]

Darsana I.G.O Besung I.N.K, Mahatmi H. 2012. Potensi Daun Binahong (*Anredera Cordifolia (Tonore) Steenis)* dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli* Secara In Vitro. *Indonesia Medicus Veterinus* 1:337-351.

Darmandi. 2008. *Infeksi nosokomial problematika dan pengendaliannya* . Jakarta : Penerbit Salemba Medika.

De Guzman, C.C and Siemonsma, JS. *Plant Resources Of South-East Asia 13*. Backhuys Publishers. Leiden. 1999; 148-151

Denyer Stephen P., Norman A. Hodges, and Sean P. Gorman. 2004. *Pharmaceutical Microbiology*. 7th. Victoria. Australia: Blackwell. Science. Halaman 346-363.

Gilanni Anwar-ul Hassan, Qaiser jabeen dan Muhammad Asad Ullah Khan. 2004. *A Review of Medicinal and Pharmacological activities of Nigella s.* Pakistan Journal of Biological Science 7 (4): 441-451

Gunawan, D. dan Mulyani, S. 2004. *Ilmu Obat Alam* (Farmakognosi). Jilid I. Jakarta: Penebar Swadaya. Hlm 1-7, 9- 13, 86-94, 104-122.

Harborne, JB. (1987). *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemah K Padmawinata. Edisi III. Bandung: ITB

Hadioetomo RS. 1985. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik Dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: Gramedia. hlm 42-44

Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM. 2010. *Farmakognosi dan Fitoterapi*. Jakarta: EGC

Hermawan A. 2007. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Disk [Skripsi]. Surabaya: Universitas Airlangga. Diakses [1 Desember 2017].

Indah *et al*. (2016) Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* [Skripsi]. Bandung: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri. Diakses [7 Desember 2017].

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1986. *Mikrobiologi Kedokteran Profesi Kesehatan,* diterjemahkan oleh Bonang G., Lange Medical Publication. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2007. *Medical Mikrobiology 2thEd*. The McGraw Hill Companies, USA.

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 25. Editor edisi bahasa Adisti adityaputri et al, Jakarta : EGC

Khalid, *et al*., 2011. *Antibacterial activity analysis of extracts of various plants against Gram positive and negative bacteria. African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 5: 887-893.

Kusmayati dan Agustini NWR. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga (*Porphyridium cruentinum*). *Biodiversitas* 8 : 48-53.

Madduluri, Suresh R, Babu K., Sitaram B. 2013. *In Vitro Evaluation of Antibacterial Activity of Five Indigenous Plants Extract Againts Five Bacterial Pathogens of Human. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science.* 5(4):679-684.

Munawaroh S; Handayani P.A. 2010. Ekstrak Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus histrix* Dc) dengan pelarut Etanol & Heksana. *Jurnal Kompetensi* 2:73-78

Mulyadi. (2011). *Auditing edisi* 6, Jakarta: Salemba Empat.

Mudihardi, Kuntaman, Warsito, Mertaniasih, Harsono, dan Alimsardjono, 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, Salemba Medika, Surabaya, Terjemah : McGraw Hill Book Company, hlm 318-320.

Nor, Aishah Hasan, Mohd. Zain Nawahwi, Haslinda AB Malek. 2013 *Antimicrobial Activity of Nigella sativa Seed Extract.* Sains Malaysiana.

Noer S, Pratiwi RD. 2016. Uji kualitatif fitokimia daun *Ruta angustifolia*. Program Studi Pendidikan Biologi [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Teknik, Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indraprasta .

Odianti G.T. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Alfa Mangostin Kulit Buah Manggis [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhamaddiyah Surakarta.

Peoloengan M, Chairul, Iyep K, Susan MN. 2006. Aktivitas antimikroba dan fitokimia dari beberapa tanaman obat. *Jurnal MIPA* 35(2): 165-174.

Pleczar MJ, Chan ECS. 1998. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. Jilid 2. Hadioetomo RS, Imam T, angka SL, penerjemah; Jakarta: UI-Press. Terjemahan dari *Elements of Microbiology*.

Power DA, Mc Cuen PJ. 1988. *Mannual BBI*. *Product and Laboratory Procedure Sixth Edition*. *Maryland*: Becton Dickinson.

Pratiwi, Sylvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga. Hlm 188.

Praeparandi. 1978. *Card System Analisa Kimia Farmasi Kualitatif*. Bandung: Seksi Diktat Stenhl. Halaman 9.

Prayudhani *et al*. 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Sawo Kecik (*Manikara kauki L Dubard*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. Jurnal SMK Negeri 1 *pasuruan dan jurusan Biologi* FMIPA Universitas Negeri Malang.

Ramyasheree M, Krishna Ram H, Shivabasavaiah. 2012. Ethnomedical value of oputia elatior fruits and its effects in mine. University of Mysore. Karnataka. India. *Journal of Pharmacy Research* 8 : 4554-4558.

Resmi M. 2011, *Metode Penelitian Tanaman Obat*. Bandung: Widya Padjajaran, Antapani.

Rinawati ND. 2011. Daya Antibakteri tumbuhan majapahit (*Cresentia cujete* L.) terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* [Tugas Akhir]. Surabaya: Program Studi Biologi. ITS.

Robinson T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Padmawinata K, Penerjemah; Bandung: ITB Press. Terjemahan dari: *The Organic Constituents of Higher Plants*. Hlm: 71-75.

Rohman A. 2015. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Etanol Daun Sante (*Alocasia macrorrhizae*. (L.)G Don) dengan Variasi Cara Pengeringan. Seminar kimia [SKRIPSI]. Surakarta: Fakultas keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Sebelas Maret.

Rostina. 2007. Uji Aktivitas Hasil Penyarian Biji Mahkota Dewa (*Phalera Macrocarpa*) Terhadap Beberapa Mikroba Penyebab Infeksi Kulit [KTT]. Bandung: Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran.

Rostinawati, T. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Terhadap *Escherichia colli*, *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Agar [Skripsi]. Bandung: Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran.

Rostika N. (2012). Pengaruh Pemberian ekstrak minyak Jintan hitam (*Nigella sativa* L.) Terhadap gambaran Histologi Organ Lambung dan Usus halus Mencit (*Mus musculus*) [skripsi]. Bogor: IPB.

Santosa, CM. 2005. Pengaruh Konsumsi Daun Bangun-bangun (*Coleus amboinicus*, L) Terhadap Potensi Sekresi ASI dan Komposisinya Pada Ibu Menyusui, *MFI* 13 : 133-139.

Suriawiria, U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Papas Sinar Sinanti.

Siswandono dan Soekardjo B. 2008. *Kimia Medisinal*. Airlangga University Press. hlm: 128.

Tiwari P., Bimlesh K, Mandeep K., Gurpreet K, Harleen K. 2011. *Skrining Fitokimia dan ekstraksi*. *International Pharmaceutica Sciencia* 1 (1).

Tone DS. Wuisan J. Mambo C. 2013. Uji efek analgesik ekstrak daun mahkota dewa *(Phaleria macrocarpa)* pada mencit *(Mus musculus). Jurnal e-Biomedik (eMB)* 1 : 873-878

Voigt R. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.

Wadud SA. 2014. Uji Efektifitas Ekstrak Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.) Terhadap Pertumbuhan *Shigella dysenteriae* [skripsi]. Jakarta : Fakultas Kedokteran, UIN Syarif Hidayatullah. Diakses [28 Desember 2017]

Zuhud E, Rahayu WP, Wijaya CH, Sari PP. 2001. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kedawung (*Parkia roxburghli* G. Don) terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Tekhnologi dan industry Pangan* 12 : 6-12.

L A M P I R A N

Lampiran 1. Determinasi Biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

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

Nomor : 250/UN27.9.6.4/Lab/2017
H a l : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -

Nama Pemesan : Lia Nurhastuti
NIM : 20144188A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Nigella sativa* L.
Familia : Ranunculaceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963) dan Sultana *et al.* (2015) :
1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a—34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53a_____**15.Ranunculaceae**
1b-3b-5a_____**2. *Nigella***
1_____***Nigella sativa* L.**

Deskripsi Tumbuhan :
Habitus : terna, semusim, tumbuh tegak, tinggi 0.2-0.9 m. Akar : akar tunggang, bercabang, berwarna putih hingga kuning kotor atau coklat kekuningan. Batang : bulat, lunak, bercabang sedikit hingga banyak. Daun : tunggal, terletak tersebar; helaian berbentuk bulat telur, berbagi menyirip 2 hingga 3, segmen daun menjadi sangat sempit, pertulangan daun menyirip, daging daun lunak, hijau muda. Bunga : tunggal, bunga berkelamin ganda (biseksual/banci), bersimetri banyak; daun kelopak berjumlah 5, biasanya berkuku, menyerupai daun mahkota, biru; daun mahkota bunga 5-10, putih atau kuning atau merah muda atau biru pucat atau ungu pucat, lebih kecil daripada daun kelopak, berkuku, berbibir 2, bibir bagian bawah bercuping 2; benangsari banyak; tangkai putik seperti benang, bakal buah dengan banyak bakal biji. Buah : berupa buah kapsul, berbentuk bulat, permukaan gundul, berisi banyak sekali biji. Biji : bijinya kecil-kecil, bulat telur terbalik atau seperti buah pir, tepinya bersudut 3, panjang 4.1 cm, lebar 2 cm, di bagian luar berwarna hitam dan bagian dalam berwarna putih, sangat aromatis dan rasanya agak sedikit pahit.

Surakarta, 20 Desember 2017

Kepala Lab. Program Studi Biologi

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

Penanggungjawab
Determinasi Tumbuhan

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

Mengetahui
Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS

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

Lampiran 2. Foto biji dan serbuk jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

Biji jinten hitam

Serbuk biji jinten hitam

Lampiran 3. Gambar timbangan, mesin penggiling simplisia dan vortex

Timbangan

Penggiling Simplisia **Vortex**

Lampiran 4. Gambar alat Sterling-bidwell, botol maserasi dan ayakan 40

Sterling-bidwell

Botol maserasi

Ayakan Mesh 40

Lampiran 5. Gambar alat oven binder, rotary evaporator, incubator, autoklaf dan ekstrak biji jinten hitam

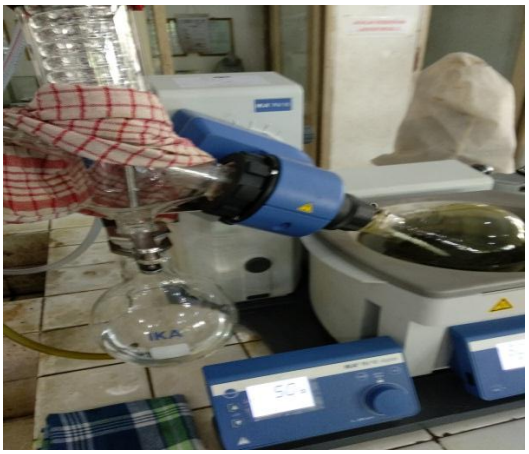


Foto Evaporator

Foto Oven Binder

Foto incubator

Foto Autoklaf

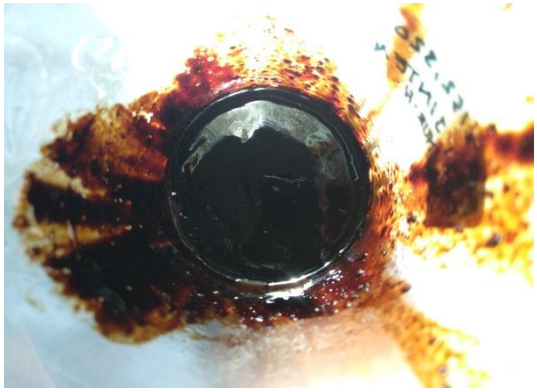
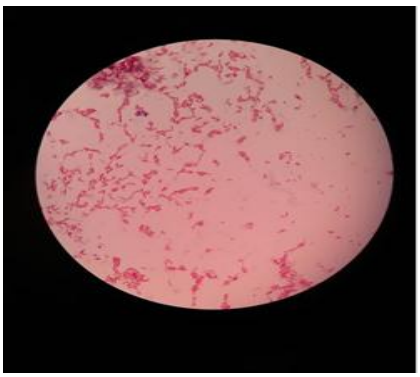
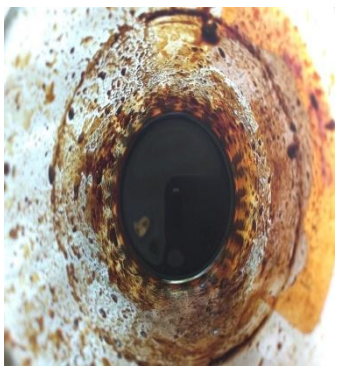


Foto Ekstrak Biji Jinten Hitam



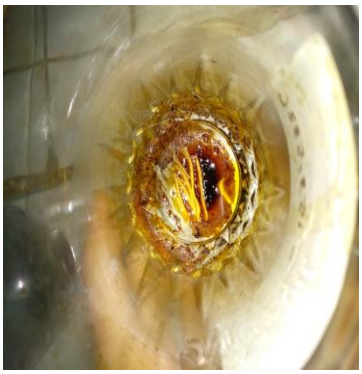
Pengecatan Gram

Lampiran 6. Foto fraksinasi, hasil fraksinasi dan tes bebas etanol pada biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)



Fraksi Air

Fraksi *n*-Heksana

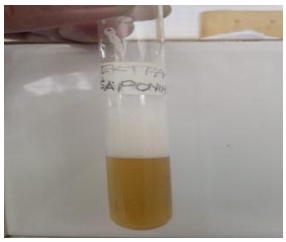
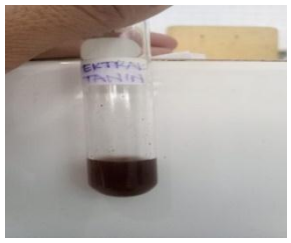
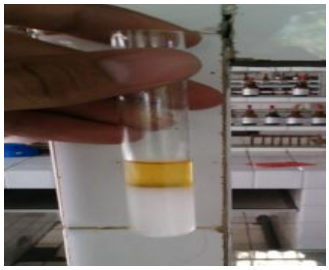
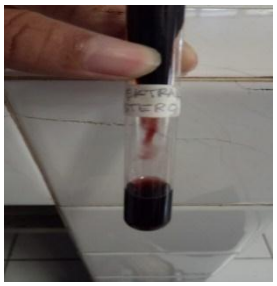


Fraksi Etil Asetat

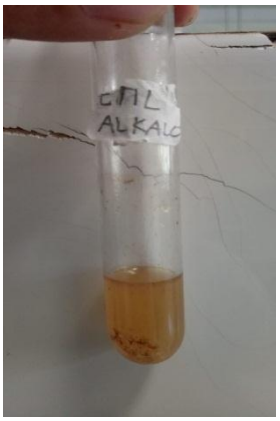
Fraksinasi Ekstrak Biji Jinten Hitam

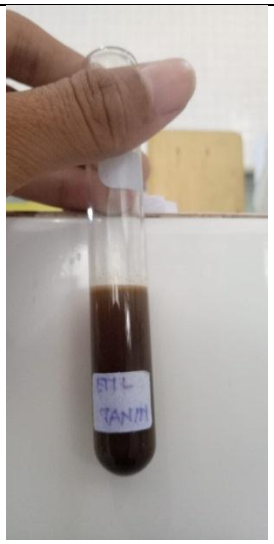
Tes bebas etanol

Lampiran 7. Foto identifikasi senyawa serbuk dan ekstrak biji jinten hitam

Senyawa	Hasil	
	Serbuk	Ekstrak
Saponin		
Alkaloid		
Tanin		
Flavonoid		
Steroid		

Lampiran 8. Foto identifikasi senyawa fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

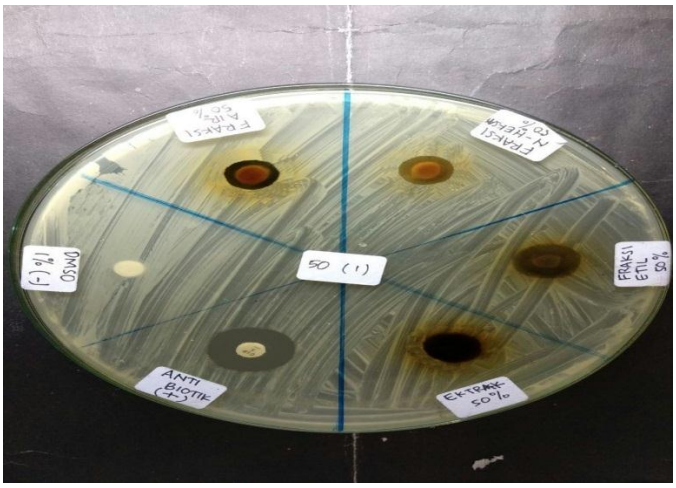
Senyawa	Hasil Fraksi		
	***n*-Heksana**	**Etil asetat**	**Air**
Saponin			
+HCL			
Alkaloid (Dragendrof)			
Alkaloid (Mayer)			

Tanin			
Flavonoid			
Steroid			

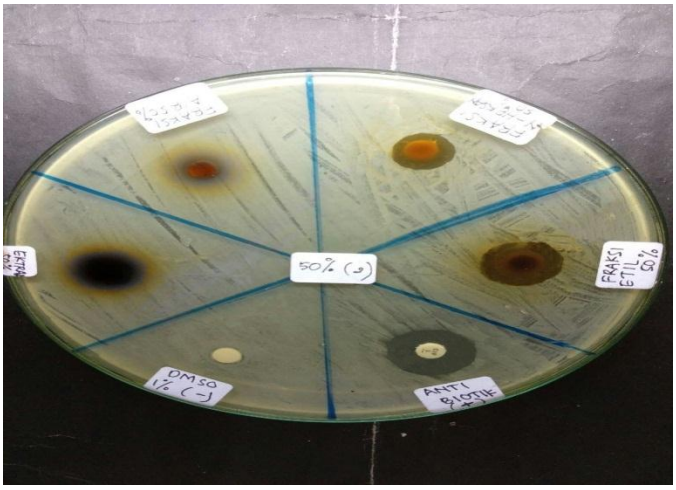
Lampiran 9. Foto hasil uji difusi

Foto difusi konsentrasi 50%

Replikasi I



Replikasi II



Replikasi III

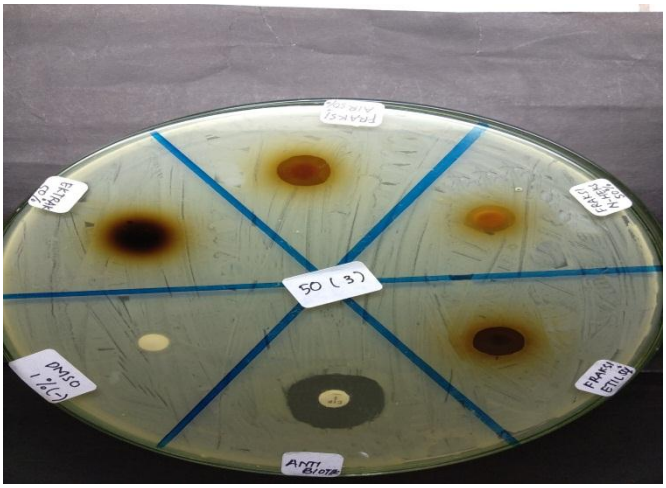
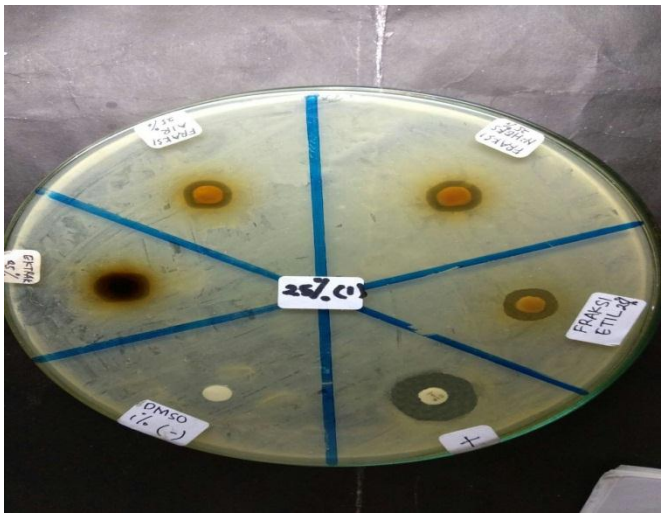
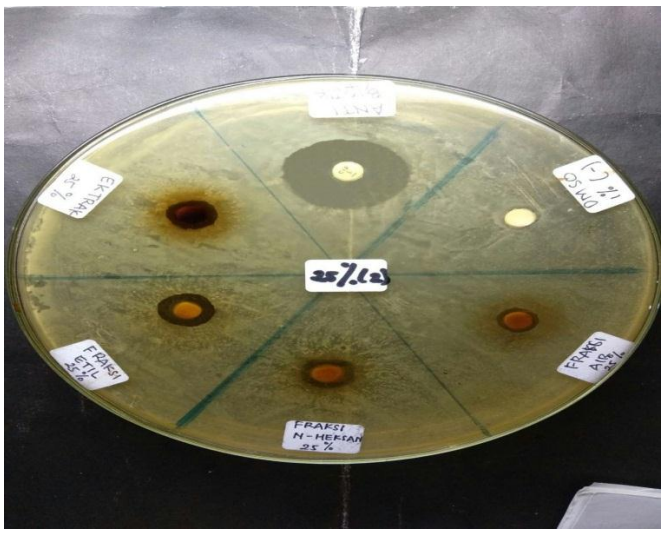


Foto difusi konsentrasi 25%

Replikasi I



Replikasi I I



Replikasi III

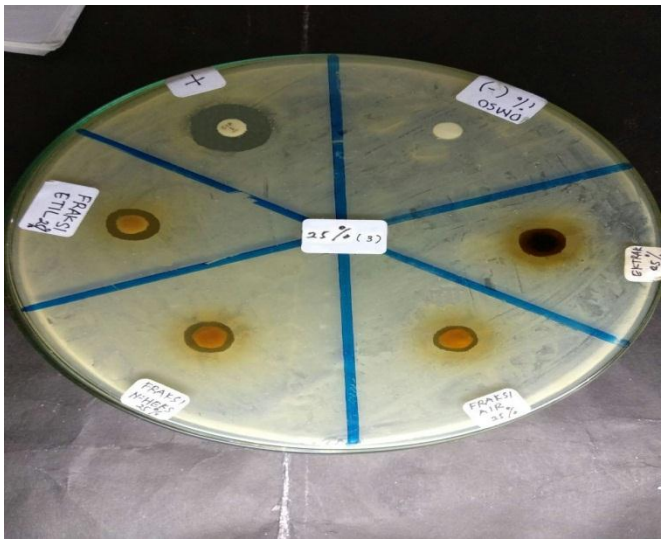
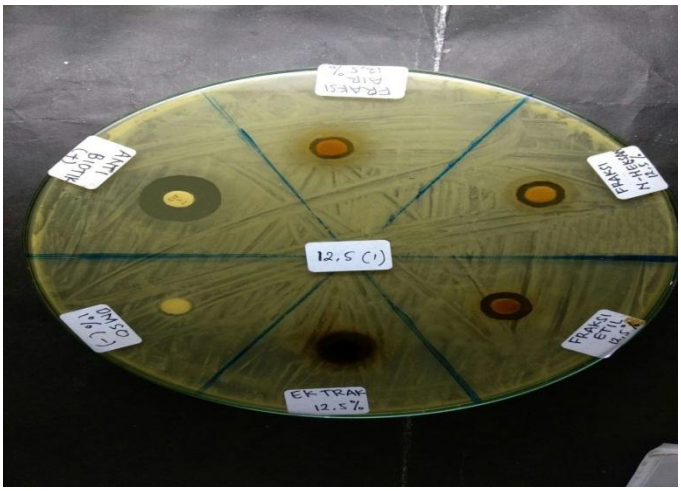
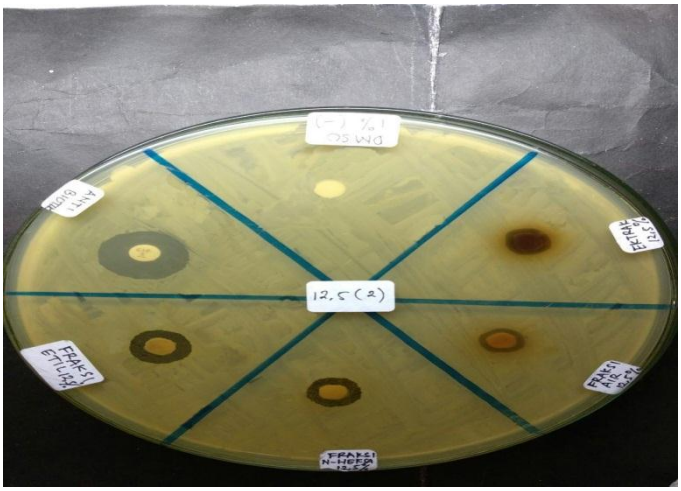


Foto difusi konsentrasi 12,5%

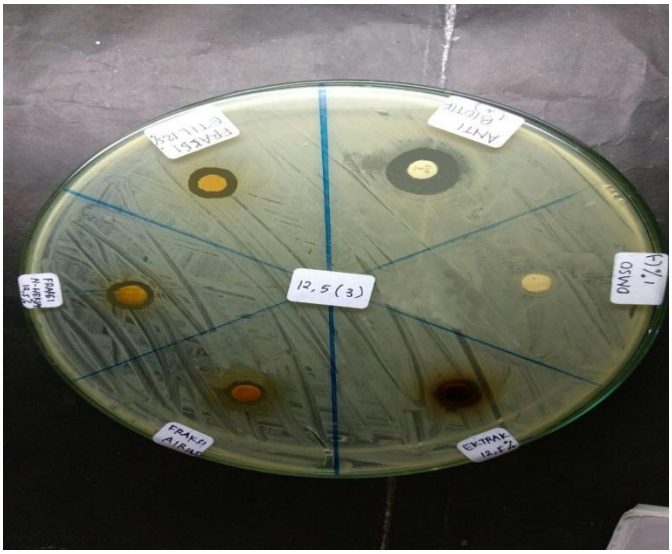
Replikasi I



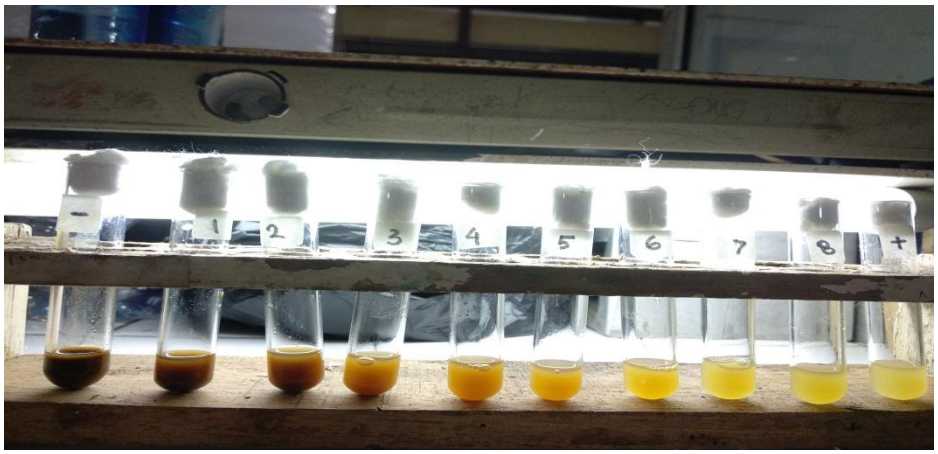
Replikasi II



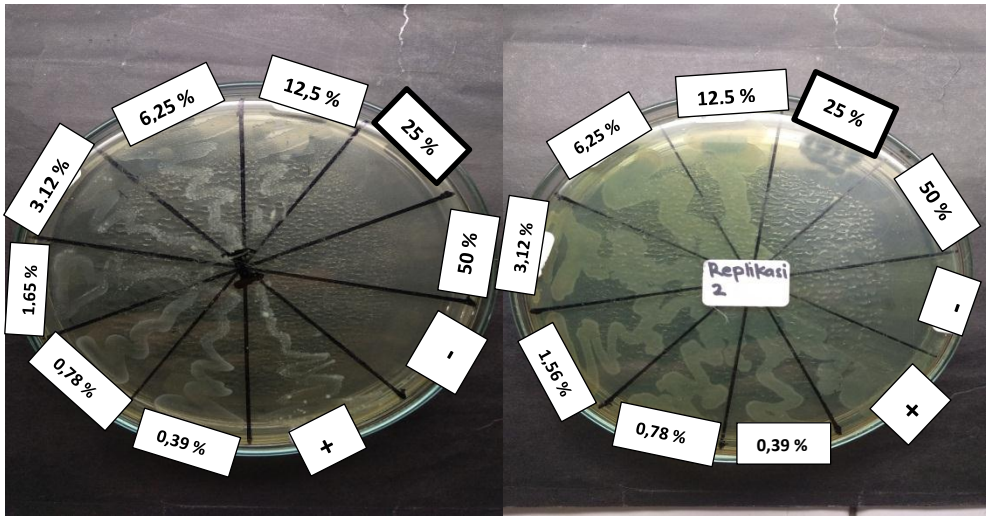
Replikasi III



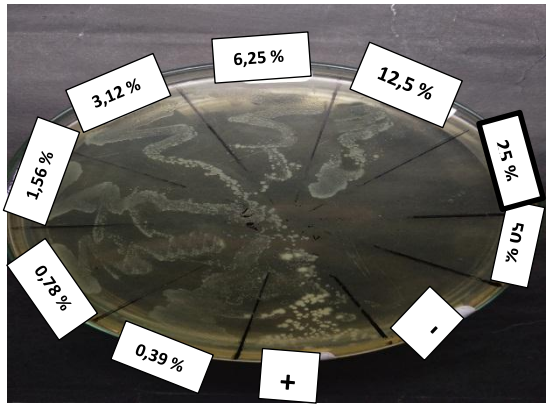
Lampiran 10. Foto hasil uji dilusi



Hasil uji dilusi fraksi teraktif (fraksi etil asetat) biji jinten hitam terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Replikasi I **Replikasi II**



Replikasi III

Lampiran 11. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

Bobot basah	Bobot kering	Persentase
1.500 gram	1.200 gram	80%

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

$= \frac{1.200\ (g)}{1.500\ (g)} \times 100\ \%$

$= 80\%$

Lampiran 12. Hasil perhitungan persen rendemen kadar lembab serbuk

Hasil penetapan kadar lembab serbuk biji jinten hitam

No	Bobot awal (gram)	Bobot akhir (gram)	Kadar lembab serbuk %
1	2	1,80	7,0
2	2	1,80	7,5
3	2	1,81	7,0
		Rata-rata	7,16

Lampiran 13. Hasil presentase ekstrak biji jinten hitam

Perhitungan kadar rendemen ekstrak

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Biji jinten hitam	Biji jinten hitam	Biji jinten hitam
1000	47,22	4,72

$\%\ \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot serbuk}}\ x\ 100\%$

$\%\ \text{Rendemen biji jinten hitam} = \frac{47{,}22\ \text{gram}}{1000\ \text{gram}}\ x\ 100\%$

$= 4{,}72\ \%$

Lampiran 14. Hasil perhitungan persen rendemen fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air biji jinten hitam (*Nigella sativa* L.)

Ekstrak etanol (gram)	Fraksi (gram)			Rendemen (%)		
	***n*-heksana**	**Etil asetat**	**Air**	***n*-heksana**	**Etil asetat**	**Air**
40	5,76	5,57	18,25	14,4%	13,92%	45,62%

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

1. Fraksi *n*-heksana

- % Rendemen fraksi $= \frac{5,76}{40}$ x 100%

  = 14,4%

2. Fraksi etil asetat

- % Rendemen fraksi $= \frac{5,57}{40}$ x 100%

  = 13,92%

3. Fraksi air

- % Rendemen fraksi $= \frac{18,25}{40}$ x 100%

  = 45,62%

Lampiran 15. Formulasi dan pembuatan media

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

Brain infusion	12,5 gram
Heart infusion	5,0 gram
Proteose peptone	10,0 gram
Glucose	2,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
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 dalam cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

b. Formulasi dan pembuatan Media *Brain Heart Infusion* (BHI)

Infus dari otak sapi	200,0 gram
Infus dari hati sapi	250,0 gram
Protease peptone	10,0 gram
Dekstrosa	2,0 gram
NaCl	5,0 gram
Dinatrium Fosfat	5,0 gram
Aquadest	ad 1000 ml
pH	7,4 ± 0,2

Cara Pembuatan : Suspensikan 37 gram bahan di atas dalam aquadest sebanyak 1000 ml, panaskan sampai larut sempurna, disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121^{o}C selama 15 menit, kemudian media diukur pH 7,4 dan masukkan ke dalam cawan petri simpan dalam kulkas.

c. Formulasi dan pembuatan *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA)

Pepton rom Casein	10,0 gram
Pepton farm Meat	3,5 gram
Laktosa	10,0 gram
Sodium sulfit	2,5 gram

Fuchsin	0,4 gram
Agar-agar	12,5 gram
pH	7,4

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 dalam cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

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
pH	7,4

Bahan-bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121^0C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (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
Glukosa	1 gram
Sodium thiosulfate	0,5 gram
Phenol red	0,024 gram
Agar-agar	12 gram
Aquadest	ad 1000 ml

pH 7,4

Bahan-bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121^0C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

f. Lysine Iron Agar (LIA)

Pepton from casein	5 gram
Yeast extract	3 gram
Glukosa	1 gram
Lysine monohidrochloride	10 gram
Sodium thiosulfate	0,04 gram
Ammonium Iron (II) citrate	0,5 gram
Bromo cresol purple	0,02 gram
Agar-agar	12,5 gram
Aquadest	ad 1000 ml, pH = 7,4

Bahan-bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121^0C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

g. Citrat Agar

Ammonium hydrogen fosfat	1 gram
DI- postassium hydrogen fosfate	1gram
Sodium chloride	5 gram
Magnesium sulfat	0,2 gram
Bromo thymol blue	0,08 gram
Agar-agar	12,5 gram
Aquadest	ad 1000 ml, pH = 7,4

Bahan-bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121^0C selama 15 menit dan dituang dalam cawan petri (Bridson 1998).

Lampiran 16. Perhitungan pengenceran DMSO (*Dimethyl Sulfoxida*)

Pembuatan DMSO konsentrasi 1%

$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_1$

$V_1 \times 100\% = 100 \text{ ml} \times 1 \text{ ml}$

$V_1 = \frac{100\ ml\ x\ 1\ \%}{100\ \%}$

$= \frac{100\ ml}{100}$

$V_1 = 1\text{ml}$

Dipipet 1 ml dari larutan awal (100%) kemudian ditambah aquadest steril sampai 100 ml.

Lampiran 17. Pembuatan larutan stok uji difusi dengan berbagai konsentrasi

1. Pembuatan konsentrasi 50 %

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

$$= \frac{1\ \text{gram}}{2\ \text{ml}}$$

Menimbang ± 1 gram ekstrak etanol atau fraksi kemudian masing-masing ditamabahkan DMSO 1% sampai volume 2 ml

2. Pembuatan konsentrasi 25 %

$$V_1 . N_1 = V_2 . N_2$$

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

$$V1 = \frac{1\ \text{mL} .\ 25\ \%}{50\ \%}$$

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

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

3. Pembuatan konsentrasi 12,5 %

$$V_1 . N_1 = V_2 . N_2$$

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

$$V1 = \frac{1\text{ml} .\ 12{,}5\ \%}{25\ \%}$$

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

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

Lampiran 18. Pembuatan larutan stok dilusi

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

Konsentrasi 50% = 0,5 gram/ml

Konsentrasi 25% = V_1 x C_1 = V_2 x C_2

0,5 x (50%) = V_2 x C_2

C_2 = 25%

Konsentrasi 12,5% = V_1 x C_1 = V_2 x C_2

0,5 x (25%) = V_2 x C_2

C_2 = 12,5%

Konsentrasi 6,25% = V_1 x C_1 = V_2 x C_2

0,5 x (12,5%) = V_2 x C_2

C_2 = 6,25%

Konsentrasi 3,125% = V_1 x C_1 = V_2 x C_2

0,5 x (6,25%) = V_2 x C_2

C_2 = 3,125%

Konsentrasi 1,56% = V_1 x C_1 = V_2 x C_2

0,5 x (3,125%) = V_2 x C_2

C_2 = 1,56%

Konsentrasi 0,78% = V_1 x C_1 = V_2 x C_2

0,5 x (1,56%) = V_2 x C_2

C_2 = 0,78%

Konsentrasi 0,39% = V_1 x C_1 = V_2 x C_2

0,5 x (0,78%) = V_2 x C_2

C_2 = 0,39%

Kontrol negatif (-) : berisi 1 ml fraksi teraktif

Kontrol positif (+) : berisi 1 ml suspensi bakteri

Lampiran 19. Standard kekeruhan *mc farland*

Volume dalam ml			
Standard	1% $BaCL_2$	1% H_2SO_4	Number of Bacteria/ ml/(10^8) represented
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

Lampiran 20. Analisis data hasil difusi

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
diameterhambat	42	13,6786	6,07155	,00	29,00

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		diameterhambat
N		42
Normal Parameters[a,,b]	Mean	13,6786
	Std. Deviation	6,07155
Most Extreme Differences	Absolute	,201
	Positive	,119
	Negative	-,201
Kolmogorov-Smirnov Z		1,302
Asymp. Sig. (2-tailed)		,067

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

diameterhambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,988	13	28	,062

ANOVA

diameterhambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1488,744	13	114,519	141,464	,000
Within Groups	22,667	28	,810		
Total	1511,411	41			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

diameterhambat
Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak 50%	ekstrak 25%	,33333	,73463	1,000	-2,3557	3,0224
	ekstrak 12,5%	1,33333	,73463	,852	-1,3557	4,0224
	fraksi n-heksana 50%	4,00000*	,73463	,001	1,3110	6,6890
	fraksi n-heksana 25%	4,00000*	,73463	,001	1,3110	6,6890
	fraksi n-heksana 12,5%	4,66667*	,73463	,000	1,9776	7,3557
	fraksi etil asetat 50%	-3,50000*	,73463	,003	-6,1890	-,8110
	fraksi etil asetat 25%	-2,66667	,73463	,054	-5,3557	,0224
	fraksi etil asetat 12,5%	-2,00000	,73463	,317	-4,6890	,6890
	fraksi air 50%	3,00000*	,73463	,019	,3110	5,6890
	fraksi air 25%	3,33333*	,73463	,006	,6443	6,0224
	fraksi air 12,5%	4,33333*	,73463	,000	1,6443	7,0224
	siprofloksasin	-13,33333*	,73463	,000	-16,0224	-10,6443
	DMSO 1%	15,00000*	,73463	,000	12,3110	17,6890
ekstrak 25%	ekstrak 50%	-,33333	,73463	1,000	-3,0224	2,3557
	ekstrak 12,5%	1,00000	,73463	,979	-1,6890	3,6890
	fraksi n-heksana 50%	3,66667*	,73463	,002	,9776	6,3557
	fraksi n-heksana 25%	3,66667*	,73463	,002	,9776	6,3557
	fraksi n-heksana 12,5%	4,33333*	,73463	,000	1,6443	7,0224
	fraksi etil asetat 50%	-3,83333*	,73463	,001	-6,5224	-1,1443
	fraksi etil asetat 25%	-3,00000*	,73463	,019	-5,6890	-,3110
	fraksi etil asetat 12,5%	-2,33333	,73463	,140	-5,0224	,3557
	fraksi air 50%	2,66667	,73463	,054	-,0224	5,3557
	fraksi air 25%	3,00000*	,73463	,019	,3110	5,6890
	fraksi air 12,5%	4,00000*	,73463	,001	1,3110	6,6890
	siprofloksasin	-13,66667*	,73463	,000	-16,3557	-10,9776
	DMSO 1%	14,66667*	,73463	,000	11,9776	17,3557
ekstrak 12,5%	ekstrak 50%	-1,33333	,73463	,852	-4,0224	1,3557
	ekstrak 25%	-1,00000	,73463	,979	-3,6890	1,6890
	fraksi n-heksana 50%	2,66667	,73463	,054	-,0224	5,3557
	fraksi n-heksana 25%	2,66667	,73463	,054	-,0224	5,3557
	fraksi n-heksana 12,5%	3,33333*	,73463	,006	,6443	6,0224
	fraksi etil asetat 50%	-4,83333*	,73463	,000	-7,5224	-2,1443
	fraksi etil asetat 25%	-4,00000*	,73463	,001	-6,6890	-1,3110
	fraksi etil asetat 12,5%	-3,33333*	,73463	,006	-6,0224	-,6443
	fraksi air 50%	1,66667	,73463	,588	-1,0224	4,3557
	fraksi air 25%	2,00000	,73463	,317	-,6890	4,6890
	fraksi air 12,5%	3,00000*	,73463	,019	,3110	5,6890
	siprofloksasin	-14,66667*	,73463	,000	-17,3557	-11,9776
	DMSO 1%	13,66667*	,73463	,000	10,9776	16,3557
fraksi n-heksana 50%	ekstrak 50%	-4,00000*	,73463	,001	-6,6890	-1,3110
	ekstrak 25%	-3,66667*	,73463	,002	-6,3557	-,9776
	ekstrak 12,5%	-2,66667	,73463	,054	-5,3557	,0224
	fraksi n-heksana 25%	,00000	,73463	1,000	-2,6890	2,6890
	fraksi n-heksana 12,5%	,66667	,73463	1,000	-2,0224	3,3557
	fraksi etil asetat 50%	-7,50000*	,73463	,000	-10,1890	-4,8110
	fraksi etil asetat 25%	-6,66667*	,73463	,000	-9,3557	-3,9776
	fraksi etil asetat 12,5%	-6,00000*	,73463	,000	-8,6890	-3,3110

	fraksi air 50%	-1,00000	,73463	,979	-3,6890	1,6890
	fraksi air 25%	-,66667	,73463	1,000	-3,3557	2,0224
	fraksi air 12,5%	,33333	,73463	1,000	-2,3557	3,0224
	siprofloksasin	-17,33333*	,73463	,000	-20,0224	-14,6443
	DMSO 1%	11,00000*	,73463	,000	8,3110	13,6890
fraksi n-heksana 25%	ekstrak 50%	-4,00000*	,73463	,001	-6,6890	-1,3110
	ekstrak 25%	-3,66667*	,73463	,002	-6,3557	-,9776
	ekstrak 12,5%	-2,66667	,73463	,054	-5,3557	,0224
	fraksi n-heksana 50%	,00000	,73463	1,000	-2,6890	2,6890
	fraksi n-heksana 12,5%	,66667	,73463	1,000	-2,0224	3,3557
	fraksi etil asetat 50%	-7,50000*	,73463	,000	-10,1890	-4,8110
	fraksi etil asetat 25%	-6,66667*	,73463	,000	-9,3557	-3,9776
	fraksi etil asetat 12,5%	-6,00000*	,73463	,000	-8,6890	-3,3110
	fraksi air 50%	-1,00000	,73463	,979	-3,6890	1,6890
	fraksi air 25%	-,66667	,73463	1,000	-3,3557	2,0224
	fraksi air 12,5%	,33333	,73463	1,000	-2,3557	3,0224
	siprofloksasin	-17,33333*	,73463	,000	-20,0224	-14,6443
	DMSO 1%	11,00000*	,73463	,000	8,3110	13,6890
fraksi n-heksana 12,5%	ekstrak 50%	-4,66667*	,73463	,000	-7,3557	-1,9776
	ekstrak 25%	-4,33333*	,73463	,000	-7,0224	-1,6443
	ekstrak 12,5%	-3,33333*	,73463	,006	-6,0224	-,6443
	fraksi n-heksana 50%	-,66667	,73463	1,000	-3,3557	2,0224
	fraksi n-heksana 25%	-,66667	,73463	1,000	-3,3557	2,0224
	fraksi etil asetat 50%	-8,16667*	,73463	,000	-10,8557	-5,4776
	fraksi etil asetat 25%	-7,33333*	,73463	,000	-10,0224	-4,6443
	fraksi etil asetat 12,5%	-6,66667*	,73463	,000	-9,3557	-3,9776
	fraksi air 50%	-1,66667	,73463	,588	-4,3557	1,0224
	fraksi air 25%	-1,33333	,73463	,852	-4,0224	1,3557
	fraksi air 12,5%	-,33333	,73463	1,000	-3,0224	2,3557
	siprofloksasin	-18,00000*	,73463	,000	-20,6890	-15,3110
	DMSO 1%	10,33333*	,73463	,000	7,6443	13,0224
fraksi etil asetat 50%	ekstrak 50%	3,50000*	,73463	,003	,8110	6,1890
	ekstrak 25%	3,83333*	,73463	,001	1,1443	6,5224
	ekstrak 12,5%	4,83333*	,73463	,000	2,1443	7,5224
	fraksi n-heksana 50%	7,50000*	,73463	,000	4,8110	10,1890
	fraksi n-heksana 25%	7,50000*	,73463	,000	4,8110	10,1890
	fraksi n-heksana 12,5%	8,16667*	,73463	,000	5,4776	10,8557
	fraksi etil asetat 25%	,83333	,73463	,996	-1,8557	3,5224
	fraksi etil asetat 12,5%	1,50000	,73463	,731	-1,1890	4,1890
	fraksi air 50%	6,50000*	,73463	,000	3,8110	9,1890
	fraksi air 25%	6,83333*	,73463	,000	4,1443	9,5224
	fraksi air 12,5%	7,83333*	,73463	,000	5,1443	10,5224
	siprofloksasin	-9,83333*	,73463	,000	-12,5224	-7,1443
	DMSO 1%	18,50000*	,73463	,000	15,8110	21,1890
fraksi etil asetat 25%	ekstrak 50%	2,66667	,73463	,054	-,0224	5,3557
	ekstrak 25%	3,00000*	,73463	,019	,3110	5,6890
	ekstrak 12,5%	4,00000*	,73463	,001	1,3110	6,6890
	fraksi n-heksana 50%	6,66667*	,73463	,000	3,9776	9,3557
	fraksi n-heksana 25%	6,66667*	,73463	,000	3,9776	9,3557
	fraksi n-heksana 12,5%	7,33333*	,73463	,000	4,6443	10,0224
	fraksi etil asetat 50%	-,83333	,73463	,996	-3,5224	1,8557
	fraksi etil asetat 12,5%	,66667	,73463	1,000	-2,0224	3,3557
	fraksi air 50%	5,66667*	,73463	,000	2,9776	8,3557
	fraksi air 25%	6,00000*	,73463	,000	3,3110	8,6890
	fraksi air 12,5%	7,00000*	,73463	,000	4,3110	9,6890
	siprofloksasin	-10,66667*	,73463	,000	-13,3557	-7,9776

	DMSO 1%	17,66667*	,73463	,000	14,9776	20,3557
fraksi etil asetat 12,5%	ekstrak 50%	2,00000	,73463	,317	-,6890	4,6890
	ekstrak 25%	2,33333	,73463	,140	-,3557	5,0224
	ekstrak 12,5%	3,33333*	,73463	,006	,6443	6,0224
	fraksi n-heksana 50%	6,00000*	,73463	,000	3,3110	8,6890
	fraksi n-heksana 25%	6,00000*	,73463	,000	3,3110	8,6890
	fraksi n-heksana 12,5%	6,66667*	,73463	,000	3,9776	9,3557
	fraksi etil asetat 50%	-1,50000	,73463	,731	-4,1890	1,1890
	fraksi etil asetat 25%	-,66667	,73463	1,000	-3,3557	2,0224
	fraksi air 50%	5,00000*	,73463	,000	2,3110	7,6890
	fraksi air 25%	5,33333*	,73463	,000	2,6443	8,0224
	fraksi air 12,5%	6,33333*	,73463	,000	3,6443	9,0224
	siprofloksasin	-11,33333*	,73463	,000	-14,0224	-8,6443
	DMSO 1%	17,00000*	,73463	,000	14,3110	19,6890
fraksi air 50%	ekstrak 50%	-3,00000*	,73463	,019	-5,6890	-,3110
	ekstrak 25%	-2,66667	,73463	,054	-5,3557	,0224
	ekstrak 12,5%	-1,66667	,73463	,588	-4,3557	1,0224
	fraksi n-heksana 50%	1,00000	,73463	,979	-1,6890	3,6890
	fraksi n-heksana 25%	1,00000	,73463	,979	-1,6890	3,6890
	fraksi n-heksana 12,5%	1,66667	,73463	,588	-1,0224	4,3557
	fraksi etil asetat 50%	-6,50000*	,73463	,000	-9,1890	-3,8110
	fraksi etil asetat 25%	-5,66667*	,73463	,000	-8,3557	-2,9776
	fraksi etil asetat 12,5%	-5,00000*	,73463	,000	-7,6890	-2,3110
	fraksi air 25%	,33333	,73463	1,000	-2,3557	3,0224
	fraksi air 12,5%	1,33333	,73463	,852	-1,3557	4,0224
	siprofloksasin	-16,33333*	,73463	,000	-19,0224	-13,6443
	DMSO 1%	12,00000*	,73463	,000	9,3110	14,6890
fraksi air 25%	ekstrak 50%	-3,33333*	,73463	,006	-6,0224	-,6443
	ekstrak 25%	-3,00000*	,73463	,019	-5,6890	-,3110
	ekstrak 12,5%	-2,00000	,73463	,317	-4,6890	,6890
	fraksi n-heksana 50%	,66667	,73463	1,000	-2,0224	3,3557
	fraksi n-heksana 25%	,66667	,73463	1,000	-2,0224	3,3557
	fraksi n-heksana 12,5%	1,33333	,73463	,852	-1,3557	4,0224
	fraksi etil asetat 50%	-6,83333*	,73463	,000	-9,5224	-4,1443
	fraksi etil asetat 25%	-6,00000*	,73463	,000	-8,6890	-3,3110
	fraksi etil asetat 12,5%	-5,33333*	,73463	,000	-8,0224	-2,6443
	fraksi air 50%	-,33333	,73463	1,000	-3,0224	2,3557
	fraksi air 12,5%	1,00000	,73463	,979	-1,6890	3,6890
	siprofloksasin	-16,66667*	,73463	,000	-19,3557	-13,9776
	DMSO 1%	11,66667*	,73463	,000	8,9776	14,3557
fraksi air 12,5%	ekstrak 50%	-4,33333*	,73463	,000	-7,0224	-1,6443
	ekstrak 25%	-4,00000*	,73463	,001	-6,6890	-1,3110
	ekstrak 12,5%	-3,00000*	,73463	,019	-5,6890	-,3110
	fraksi n-heksana 50%	-,33333	,73463	1,000	-3,0224	2,3557
	fraksi n-heksana 25%	-,33333	,73463	1,000	-3,0224	2,3557
	fraksi n-heksana 12,5%	,33333	,73463	1,000	-2,3557	3,0224
	fraksi etil asetat 50%	-7,83333*	,73463	,000	-10,5224	-5,1443
	fraksi etil asetat 25%	-7,00000*	,73463	,000	-9,6890	-4,3110
	fraksi etil asetat 12,5%	-6,33333*	,73463	,000	-9,0224	-3,6443
	fraksi air 50%	-1,33333	,73463	,852	-4,0224	1,3557
	fraksi air 25%	-1,00000	,73463	,979	-3,6890	1,6890
	siprofloksasin	-17,66667*	,73463	,000	-20,3557	-14,9776
	DMSO 1%	10,66667*	,73463	,000	7,9776	13,3557
siprofloksasin	ekstrak 50%	13,33333*	,73463	,000	10,6443	16,0224
	ekstrak 25%	13,66667*	,73463	,000	10,9776	16,3557
	ekstrak 12,5%	14,66667*	,73463	,000	11,9776	17,3557

	fraksi n-heksana 50%	17,33333*	,73463	,000	14,6443	20,0224
	fraksi n-heksana 25%	17,33333*	,73463	,000	14,6443	20,0224
	fraksi n-heksana 12,5%	18,00000*	,73463	,000	15,3110	20,6890
	fraksi etil asetat 50%	9,83333*	,73463	,000	7,1443	12,5224
	fraksi etil asetat 25%	10,66667*	,73463	,000	7,9776	13,3557
	fraksi etil asetat 12,5%	11,33333*	,73463	,000	8,6443	14,0224
	fraksi air 50%	16,33333*	,73463	,000	13,6443	19,0224
	fraksi air 25%	16,66667*	,73463	,000	13,9776	19,3557
	fraksi air 12,5%	17,66667*	,73463	,000	14,9776	20,3557
	DMSO 1%	28,33333*	,73463	,000	25,6443	31,0224
DMSO 1%	ekstrak 50%	-15,00000*	,73463	,000	-17,6890	-12,3110
	ekstrak 25%	-14,66667*	,73463	,000	-17,3557	-11,9776
	ekstrak 12,5%	-13,66667*	,73463	,000	-16,3557	-10,9776
	fraksi n-heksana 50%	-11,00000*	,73463	,000	-13,6890	-8,3110
	fraksi n-heksana 25%	-11,00000*	,73463	,000	-13,6890	-8,3110
	fraksi n-heksana 12,5%	-10,33333*	,73463	,000	-13,0224	-7,6443
	fraksi etil asetat 50%	-18,50000*	,73463	,000	-21,1890	-15,8110
	fraksi etil asetat 25%	-17,66667*	,73463	,000	-20,3557	-14,9776
	fraksi etil asetat 12,5%	-17,00000*	,73463	,000	-19,6890	-14,3110
	fraksi air 50%	-12,00000*	,73463	,000	-14,6890	-9,3110
	fraksi air 25%	-11,66667*	,73463	,000	-14,3557	-8,9776
	fraksi air 12,5%	-10,66667*	,73463	,000	-13,3557	-7,9776
	siprofloksasin	-28,33333*	,73463	,000	-31,0224	-25,6443

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

Homogeneous Subsets

diameterhambat

Tukey HSD[a]

		Subset for alpha = 0.05								
perlakuan	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DMSO 1%	3	,0000								
fraksi n-heksana 12,5%	3		10,3333							
fraksi air 12,5%	3		10,6667							
fraksi n-heksana 50%	3		11,0000	11,0000						
fraksi n-heksana 25%	3		11,0000	11,0000						
fraksi air 25%	3		11,6667	11,6667						
fraksi air 50%	3		12,0000	12,0000	12,0000					
ekstrak 12,5%	3			13,6667	13,6667	13,6667				
ekstrak 25%	3				14,6667	14,6667	14,6667			
ekstrak 50%	3					15,0000	15,0000	15,0000		
fraksi etil asetat 12,5%	3						17,0000	17,0000	17,0000	
fraksi etil asetat 25%	3							17,6667	17,6667	
fraksi etil asetat 50%	3								18,5000	
siprofloksasin	3									28,3333
Sig.		1,000	,588	,054	,054	,852	,140	,054	,731	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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