

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSAN,
ETIL ASETAT, DAN AIR DARI DAUN ALPUKAT (*Persea americana* Mill)
TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**



Oleh :

**Maria Teresa Baung
20144312 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSAN,
ETIL ASETAT, DAN AIR DARI DAUN ALPUKAT (*Persea americana* Mill)
TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

**SKRIPSI**
*Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Mencapai
Derajat Sarjana Farmasi (S.F)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh:

**Maria Teresa Baung
20144312 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul:

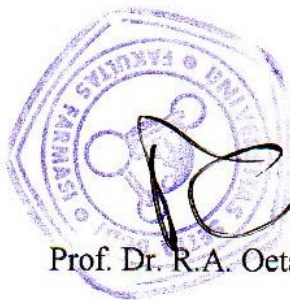
UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN ALPUKAT (*Persea americana* Mill) TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Oleh:

Maria Teresa Baung
20144312s A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 18 April 2018

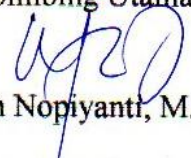
Mengetahui
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



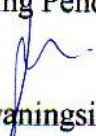
Dekan,

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

Pembimbing Utama


Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt.

Pembimbing Pendamping


Desi Purwaningsih, S.Pd., M.Si.

Penguji :

1. Drs. Edy Prasetya, M.Si.
2. Dr. Wiwin Herdwiani, M.Sc., Apt.
3. Dr. Drs. Supriyadi, M.Si.
4. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt.


1.

2.

3.

4.

PERNYATAAN

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

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

Surakarta, 9 April 2018



Maria Teresa Baung

HALAMAN PERSEMBAHAN

*“Dengarkanlah nasihat dan terimalah didikan,
supaya engkau menjadi bijak di masa depan.”*

Amsal 19:20

“Sebab bagi Allah tidak ada yang mustahil.”

Lukas 1:37

*”Dan ketahuilah, Aku menyertai kamu sampai
kepada akhir Zaman.”*

Matius 6:33

Skripsi ini kupersembahkan kepada:

*Tuhan Yesus Kristus dan Bunda Maria
Bapa, Mama, kakak, adik tercinta yang
telah mendukung dan mendoakanku.*

*Anak-anak Blue ocean, Ka Lia Aven, Bro
Andre, Ka Dovan yang selalu memberikan
dukungan dan motivasi.*

*Teman - teman seperjuangan Fakultas
Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
Almamater, Bangsa dan Negara.*

KATA PENGANTAR

Puji Tuhan, segala puji dan syukur kepada Tuhan yang telah memberi berkat dan kebijaksanaan, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI DAUN ALPUKAT (*Persea americana* Mill) TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853”**. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

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

1. Dr. Djon Tarigan, MBA selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Vivin Nopiyanti, S.Farm.,M.Sc., Apt. selaku Pembimbing Utama dan Desi Purwaningsih, S.Pd.,M.Si selaku Pembimbing Pendamping yang telah berkenan mengorbankan waktunya guna membimbing, memberi nasehat, dan mengarahkan penulis pada saat penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Dosen penguji yang telah memberikan masukan demi kesempurnaan dalam skripsi ini.
5. Seluruh Dosen, Asisten Dosen, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi.
6. Bapak, Mama, Nerys, Vany, Joan serta seluruh keluarga besarku yang telah memberikan cinta, kasih sayang, doa, dukungan dan pengorbanan, serta semangat untuk segera menyelesaikan skripsi ini.
7. Sahabat dan teman-teman atas bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan penelitian skripsi ini.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan oleh karena itu, penulis sangat menerima kritikan atau saran yang bersifat membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang mempelajarinya.

Surakarta, 9 April 2018



Maria Teresa Baung

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
INTISARI.....	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah.....	2
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Kegunaan Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. Tanaman Alpukat	4
1. Sistematika tanaman.....	4
2. Morfologi tanaman alpukat	4
3. Khasiat tanaman	5
4. Kandungan kimia	5
4.1 Flavonoid.	5
4.2 Alkaloid.....	5
4.3 Saponin.	6
B. Simplisia	6
1. Pengertian simplisia	6
2. Pengeringan simplisia.....	7
C. Penyarian	7
1. Ekstraksi	7
2. Maserasi.....	8
3. Fraksinasi.....	8
4. Cairan penyari untuk ekstraksi	9
4.1 Etanol.....	9
4.2 n-heksana.....	9
4.3 Etil asetat.	9

4.4 Air.....	10
D. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1. Definisi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2. Morfologi.....	10
3. Patogenesis	11
E. Mekanisme Antibakteri.....	12
1. Menghambat metabolisme sel mikroba.....	12
2. Menghambat sintesis dinding sel mikroba	12
3. Mengganggu permeabilitas membran sel mikroba	12
4. Menghambat sintesis protein sel mikroba	12
5. Menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba	13
F. Uji Aktivitas Antibakteri	13
G. Media	14
H. Sterilisasi	15
I. Siprofloksasin.....	15
J. Kromatografi Lapis Tipis.....	16
K. Landasan Teori.....	17
L. Hipotesis	18
BAB III METODE PENELITIAN.....	19
A. Populasi dan Sampel	19
B. Variabel Penelitian	19
1. Identifikasi variabel utama	19
2. Klasifikasi variabel utama	19
3. Defenisi operasional variabel utama	20
C. Bahan dan Alat.....	20
1. Bahan.....	20
1.1 Bahan sampel.....	20
1.2 Bakteri uji.....	21
1.3 Medium uji.....	21
1.4 Bahan kimia.	21
2. Alat	21
D. Jalannya Penelitian	21
1. Identifikaasi daun alpukat	21
2. Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk daun alpukat	21
3. Penetapan susut pengeringan.....	21
4. Pembuatan ekstrak etanol 70% daun alpukat	22
5. Uji bebas etanol daun alpukat	23
6. Pengujian kandungan kimia ekstrak daun alpukat	23
6.1 Identifikasi flavonoid.....	23
6.2 Identifikasi alkaloid.	23
6.3 Identifikasi saponin.....	23
7. Fraksinasi.....	23
8. Pembuatan suspensi bakteri uji	24
9. Identifikasi bakteri secara uji biokimia	25
10. Pengujian aktivitas antibakteri	25

10.1	Media SIM.	25
10.2	Media KIA.	25
10.3	Media LIA.	25
10.4	Media Citrat.	26
10.5	Pengujian antibakteri secara difusi.	26
11.	Pengujian antibakteri secara dilusi.	26
12.	Kromatografi Lapis Tipis	29
12.1	Identifikasi flavonoid.	30
12.2	Identifikasi alkaloid.	30
12.3	Identifikasi saponin.	30
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		31
A.	Hasil Penelitian	31
1.	Hasil identifikasi tanaman alpukat (<i>Persea americana</i> Mill) .	31
1.1	Determinasi tanaman.	31
1.2	Deskripsi tanaman.	31
2.	Hasil pengumpulan bahan, pengeringan, dan pembuatan serbuk daun alpukat.	32
3.	Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun alpukat	32
4.	Hasil pembuatan ekstrak daun alpukat	32
5.	Hasil uji bebas etanol daun alpukat	33
6.	Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun alpukat	34
7.	Hasil fraksinasi ekstrak daun alpukat	36
7.1	Fraksi n-heksan.	36
7.2	Fraksi etil asetat.	37
7.3	Fraksi air.	37
8.	Pembuatan suspensi bakteri uji	37
9.	Hasil identifikasi bakteri uji	38
9.1	Identifikasi bakteri secara goresan.	38
9.2	Identifikasi bakteri uji secara biokimia.	38
10.	Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun alpukat.	41
10.1	Hasil pengujian antibakteri secara difusi.	41
10.2	Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi.	42
11.	Hasil identifikasi fraksi paling aktif secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	43
11.1.	Hasil identifikasi flavonoid.	43
11.2.	Hasil identifikasi alkaloid.	44
BAB V PENUTUP		46
A.	Kesimpulan	46
B.	Saran	46
DAFTAR PUSTAKA		47
LAMPIRAN		51

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol daun alpukat.....	22
Gambar 2. Skema diagram kerja pembuatan fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak daun alpukat	24
Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif terhadap bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	28
Gambar 4. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan hasil fraksinasi daun alpukat terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	29
Gambar 5. Reaksi Flavonoid dengan Logam Mg dan HCl (Septyangsih 2010).....	34
Gambar 6. Reaksi uji mayer (Marliana dkk, 2005).....	35
Gambar 7. Reaksi Uji Dragendroff	35
Gambar 8. Reaksi Hidrolisis Saponin dalam Air	36
Gambar 9. Hasil identifikasi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara inokulasi	38
Gambar 10. Hasil identifikasi bakteri uji <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	39
Gambar 11. Hasil identifikasi flavonoid fraksi etil asetat daun alpukat pada fase diam silika gel GF ₂₅₄ dan fase gerak kloroform:metanol (2:3).....	43
Gambar 12. Hasil identifikasi alkaloid fraksi etil asetat daun alpukat pada fase diam silika gel GF ₂₅₄ dan fase gerak kloroform:metanol (2:3)	44

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun alpukat.....	32
Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan daun alpukat	32
Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun alpukat.....	33
Tabel 4. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun alpukat	33
Tabel 5. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun alpukat	34
Tabel 6. Rendemen hasil fraksinasi n-Heksan	36
Tabel 7. Rendemen hasil fraksinasi etil asetat daun alpukat.....	37
Tabel 8. Rendemen hasil fraksi air dari daun alpukat	37
Tabel 9. Identifikasi uji biokimia <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
Tabel 10. Diameter zona hambat ujia aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi daun alpukat terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	41
Tabel 11. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun alpukat terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Determinasi daun alpukat	51
Lampiran 2. Foto Tanaman Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.).....	52
Lampiran 3. Foto ekstrak dan fraksi daun alpukat	53
Lampiran 4. Alat penelitian.....	54
Lampiran 5. Foto uji bebas etanol dan identifikasi kandungan kimia ekstrak daun alpukat	55
Lampiran 6. Hasil uji antibakteri ekstrak dan fraksi daun alpukat terhadap bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara difusi	56
Lampiran 7. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun alpukat terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 secara dilusi	58
Lampiran 8. Hasil uji KLT fraksi teraktif etil asetat dan perhitungan Rf	62
Lampiran 9. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah	64
Lampiran 10. Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.)	65
Lampiran 11. Perhitungan rendemen fraksi <i>n</i> -heksan dari daun alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.).....	66
Lampiran 12. Perhitungan rendemen fraksi etil asetat dari daun alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.).....	68
Lampiran 13. Perhitungan rendemen fraksi air dari daun alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.)	70
Lampiran 14. Pembuatan larutan dengan berbagai konsentrasi.....	72
Lampiran 15. Formulaasi dan pembuatan media	73

INTISARI

MARIA TERESA B., 2018, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI DAUN ALPUKAT (*Persea americana* Mill) TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Tanaman alpukat merupakan salah satu tanaman yang dapat mengatasi penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Bagian dari tanaman alpukat yang bisa digunakan sebagai obat adalah biji alpukat, daging alpukat, dan buah alpukat. Daun alpukat mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, dan saponin. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air ekstrak etanolik daun alpukat (*Persea americana* Mill) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Serbuk daun alpukat diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Pengujian terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan metode difusi untuk mengetahui fraksi teraktif kemudian dilanjutkan dengan metode dilusi untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum fraksi teraktif. Konsentrasi yang digunakan pada metode difusi adalah 41,67% dan pada metode dilusi digunakan konsentrasi 41,67%; 20,83%; 10,41%; 5,20%; 2,6%; 1,3%; 0,65%; 0,32%; 0,16%; 0,08%.

Hasil penelitian menunjukkan fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air ekstrak etanol daun alpukat mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada konsentrasi 41,67%. Rata-rata diameter hambat fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air adalah 24,67 mm; 29,33 mm; dan 14,00 mm. Fraksi yang paling aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah fraksi etil asetat dengan Konsentrasi Bunuh Minimum adalah 12,5%.

Kata kunci: daun alpukat, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air, antibakteri, *pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

MARIA TERESA B., 2018, ANTIBACTERIAL ACTIVITY ETHANOLIC EXTRACT, FRACTIONS TEST OF n-HEXANE, ETHYL ACETATE AND WATER FROM ALPUKAT LEAVES (*Persea americana* Mill) AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Avocado plants are one of the plants that can overcome the infection caused by bacteria. Part of the avocado plants that can be used as medicines are avocado seeds, avocado meat, and avocado fruits. Avocado leaves contain alkaloids, flavonoids, and saponins. This study aims to test the antibacterial activity of n-hexane fraction, ethyl acetate fraction, and water fraction of ethanolic extract of avocado leaf (*Persea americana* Mill) against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bacterium.

Avocado leaf powder was extracted by maseration method using 70% ethanol solvent. The extracts obtained were fractionated with n-hexane, ethyl acetate and water solvents. Testing of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bacteria using diffusion method to find out the most active fraction then continued with dilution method to know Minimum Kill Concentration active fraction. The concentration used in the diffusion method was 41,67% and in the dilution method was used 41,67% concentration; 20,83%; 10,41%; 5,20%; 2,6%; 1,3%; 0,65%; 0,32%; 0,16%; 0,08%.

The results showed that the fraction of n-hexane, ethyl acetate fraction, and water fraction of ethanol extract of avocado leaves had antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 at concentration 41,67%. Mean inhibitory diameter of n-hexane fraction, ethyl acetate fraction, and water fraction was 24.67 mm; 29.33 mm; and 14.00 mm. The most active fraction of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 is an ethyl acetate fraction with a Minimum Kill Concentration of 12.5%.

Keywords : Alpukat leaves, n-heksan fraction, ethyl acetat fraction, and water fraction, antibacterial, *Pseudomonas aeruginosa*.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kemajuan teknologi dan ilmu pengetahuan di Indonesia khususnya di bidang kesehatan begitu pesat, akan tetapi tidak bisa begitu saja menghilangkan arti pengobatan tradisional, karena sudah sejak jaman dahulu masyarakat Indonesia memakai tanaman obat sebagai upaya penanggulangan masalah kesehatan. Praktisi kesehatan banyak memanfaatkan obat tradisional sebagai penunjang pengobatan modern. Imunostimulator tidak langsung memfagosit mikroorganisme apabila tubuh mengalami luka melainkan memacu system imun melalui mekanisme efektor system imun. Luka adalah rusaknya kulit dan gangguan jaringan-jaringan yang berada di dalamnya, seperti pembuluh darah, saraf, otot, selaput tulang dan kadang-kadang tulang itu sendiri. Infeksi dapat terjadi apabila luka diabaikan. Mikroorganisme yang ada di sekeliling luka dapat masuk ke dalam tubuh sehingga kulit, jaringan pengikat, otot, saraf, pembuluh darah, tendon, dan selaput tulang dapat dijangkitinya (Sudaryono 2011).

Penyakit infeksi masih merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk di negara Indonesia. Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh bakteri (Radji 2011). *Pseudomonas aeruginosa* adalah salah satu bakteri yang dapat menyebabkan penyakit infeksi pada hewan dan manusia. Bakteri ini merupakan penyebab utama infeksi pneumonia nosokomial dan luka bernanah, menimbulkan pus hijau kebiruan. Penyakit karena *Pseudomonas aeruginosa* dimulai dengan penempelan dan kolonisasi bakteri ini pada jaringan inang. Bakteri ini menggunakan fli untuk penempelan sel bakteri pada permukaan inang (Jawetz *et al.* 2012). Banyak tanaman yang dapat digunakan sebagai obat tradisional untuk mengatasi berbagai penyakit termasuk infeksi, karena banyak orang beranggapan bahwa penggunaan obat tradisional relatif lebih aman dibandingkan dengan obat yang berasal dari bahan kimia. Tanaman alpukat (*Persea americana* Mill) merupakan salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat.

Bagian dari tanaman alpukat yang bisa digunakan sebagai obat adalah biji alpukat, daging alpukat dan daun alpukat. Penelitian yang dilakukan oleh Christianto *et al.* (2012) menyatakan bahwa kandungan flavonoid yang terdapat dalam daun alpukat (*Persea americana* Mill) mempunyai aktivitas sebagai antifungi, antiviral, dan antibakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Nilda *et al.* (2011) kemampuan antibakteri yang dimiliki oleh daun alpukat dimungkinkan karena adanya metabolit sekunder seperti alkaloid, saponin, dan flavonoid. Hasil penelitian Ismiyati (2014) menyatakan bahwa adanya aktivitas antibakteri ekstrak daun alpukat terhadap *Staphylococcus aureus* yaitu sebesar 17.5 %. Berdasarkan penelitian Fauzia dan Larasati (2008) ekstrak daun alpukat 50% dan 100% terbukti cukup efektif dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan fraksi dari ekstrak etanolik bertujuan untuk melihat kandungan yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya terlihat adanya potensi antibakteri yang dimiliki daun alpukat, sehingga pada penelitian ini bermaksud untuk mengkaji lebih lanjut mengenai kemampuan antibakteri fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanolik daun alpukat (*Persea americana* Mill) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

B. Perumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini berdasarkan uraian latar belakang di atas adalah:

Pertama, apakah ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun alpukat (*Persea americana* Mill) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853?

Kedua, manakah dari ketiga fraksi tersebut yang mempunyai aktivitas antibakteri yang paling aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853?

Ketiga, berapakah Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) fraksi teraktif dari ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

Pertama, untuk mengetahui dan membuktikan aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan fraksi air dari daun alpukat (*Persea americana* Mill) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853.

Kedua, untuk mengetahui fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun alpukat yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilihat dari masing-masing KBM.

Ketiga, untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan informasi bagi pembaca dan masyarakat serta dapat menambah ilmu pengetahuan di bidang obat tradisional untuk digunakan dalam upaya pemanfaatan daun alpukat (*Persea americana* Mill) sebagai obat tradisional terutama sebagai obat antibakteri. Bagi peneliti diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah tentang manfaat ekstrak dan fraksi daun alpukat (*Persea americana* Mill) sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian lanjutan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Alpukat

1. Sistematika tanaman

Klasifikasi lengkap tanaman alpukat adalah sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Ranales
Keluarga	: Lauraceae
Marga	: Persea
Varietas	: <i>Persea americana</i> Mill (Herbie 2015)

2. Morfologi tanaman alpukat

Pohon alpukat berukuran kecil, tingginya \pm 3-10 meter. Pohon alpukat memiliki akar tunggang, memiliki batang kayu bulat, warna batangnya coklat kotor, batang pohon alpukat memiliki banyak cabang. Ranting pohon alpukat memiliki rambut halus dan memiliki tangkai yang panjangnya 1.5-5 cm. Tanaman alpukat memiliki daun tunggal, letak daunnya berdesakan di ujung ranting, bentuk daun alpukat jorong sampai bundar telur memanjang, tebal seperti kulit, ujung dan pangkal daun alpukat runcing, tepi rata kadang-kadang agak menggulung ke atas. Daun alpukat bertulang menyirip, panjang 10-20 cm, lebar 3-10 cm. Daun alpukat muda warnanya kemerahan dan berambut rapat, sedangkan daun alpukat tua warnanya hijau dan gundul. Bunga tanaman alpukat majemuk, berkelamin dua, tersusun dalam malai yang keluar dekat ujung ranting, warna bunga tanaman alpukat kuning kehijauan. Buah alpukat buni, bentuk bola atau bulat telur, panjang 5-20 cm, warna buah alpukat hijau atau hijau kekuningan, berbintik-bintik ungu, pohon alpukat jarang sekali berbiji satu. Daging buah alpukat jika sudah masak lunak, warna dagingnya hijau kekuningan. Biji alpukat bulat seperti bola, diameter 2.5-5 cm. Keping biji putih kemerahan (Herbie 2015).

3. Khasiat tanaman

Berdasarkan penelitian Fauzia dan Larasati (2008) ekstrak daun alpukat 50% dan 100% terbukti cukup efektif dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Selain sebagai antibakteri, daun alpukat bersifat sebagai antioksidan, analgetik, dan antiinflamasi.

4. Kandungan kimia

Menurut Cushnie *et al.* kandungan daun alpukat antara lain saponin, alkaloid, flavonoid, polifenol, dan quersetin. Menurut Nilda dkk. (2011) kemampuan antibakteri yang dimiliki daun alpukat dimungkinkan karena adanya metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, dan saponin.

4.1 Flavonoid. Senyawa flavonoid termasuk ke dalam senyawa fenol yang merupakan benzena tersubstitusi dengan gugus $-OH$, senyawa flavonoid ini banyak diperoleh dari tumbuhan, zat ini biasanya berwarna merah, ungu, biru, dan kuning. Flavonoid disintesis di dalam tumbuhan. Senyawa flavonoid biasanya diidentifikasi dengan menggunakan peralatan instrumen yaitu spektrofotometer UV-Vis dan Spektrofotometer Inframerah (Sulistiono 2012). Secara *in vitro*, senyawa flavonoid telah terbukti mempunyai efek biologis yang sangat kuat sebagai antioksidan. Sifat antiradikal flavonoid terutama pada radikal hidroksil, anion superoksida, radikal peroksil, dan alkoksil (Winarsi 2007). Flavonoid mempunyai banyak aktivitas biologi antara lain sebagai antimikroba, antikanker, antiulcer, esterogenik, inhibitor sintesis prostaglandin, inhibitor topoisomerase, dan inhibitor protein kinase (Sujata dkk., 2005). Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk kompleks protein yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Julianatina 2008).

4.2 Alkaloid. Alkaloid adalah basa organik yang mengandung amina sekunder, tersier atau siklik. Alkaloid adalah golongan yang sangat heterogen berkisar dari senyawa-senyawa sederhana sampai ke struktur pentasiklik. Banyak alkaloid adalah terpenoid di alam dan beberapa adalah steroid. Senyawa lainnya adalah senyawa-senyawa aromatik (Fattoruso & Scafati 2008). Alkaloid dapat menghambat esterase, DNA dan RNA polimerase serta menghambat respirasi sel dan berperan dalam interkalasi DNA. Menurut (Ajizah 2004) Alkaloid dapat

mengganggu terbentuknya jembatan seberang silang komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut.

4.3 Saponin. Saponin berasal dari bahasa latin *Saponin* yang berarti sabun karena sifatnya menyerupai sabun. Saponin merupakan senyawa aktif yang permukaannya kuat yang menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah menyebabkan hemolisis sel darah merah. Sifat-sifat saponin adalah mempunyai rasa pahit, dalam larutan air membentuk busa yang stabil, menghemolisa eritrosit, membentuk persenyawaan dengan kolesterol dan hidroksi steroid lainnya, sulit untuk dimurnikan dan diidentifikasi, berat molekul relatif tinggi (Lenny 2006). Menurut Utami (2013) Saponin merupakan zat aktif yang dapat meningkatkan permeabilitas membran sehingga terjadi hemolisis sel. Apabila saponin berinteraksi dengan sel bakteri atau jamur maka bakteri tersebut akan rusak atau lisis.

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bentuk jamak dari kata *simpleks* yang berasal dari kata *simple* berarti satu atau sederhana. Istilah simplisia dipakai untuk menyebutkan bahan-bahan obat alam yang masih berada dalam wujud aslinya atau belum mengalami perubahan bentuk.

Simplisia adalah bahan alami yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Berdasarkan hal itu simplisia dibagi menjadi 3 golongan yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelican. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh bagian tanaman atau eksudat tanaman. Eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau isi sel yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya, atau zat-zat nabati lainnya dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya dan belum berupa zat kimia murni.

Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelican (mineral) adalah simplisia yang berupa bahan pelican (mineral) yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Gunawan & Mulyani 2004).

2. Pengeringan simplisia

Tujuan pengeringan simplisia adalah untuk menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri. Pengeringan bahan simplisia dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu pengeringan di bawah sinar matahari dan pengeringan teduh. Kelemahan pengeringan di bawah sinar matahari adalah membutuhkan suhu dan kelembaban yang tidak terkontrol, membutuhkan tempat yang luas dan terbuka sehingga kemungkinan terjadi kontaminasi mikroba lebih besar. Pengeringan di tempat teduh biasanya digunakan untuk bahan baku simplisia yang kandungan utamanya minyak atsiri atau senyawa lain yang sifatnya termolabil (Depkes 2008).

C. Penyarian

1. Ekstraksi

Ekstraksi adalah sediaan kering, kental atau cair, dibuat dengan mengambil sari simplisia nabati atau hewani dengan cara yang sesuai, diluar pengaruh cahaya matahari langsung. Cairan penyari yang digunakan antara lain air, eter, atau campuran etanol dan air. Penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat menggunakan pelarut yang dipilih sehingga zat yang diinginkan larut. Bahan mentah obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan dan dikeringkan. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi untuk memperoleh ekstrak yang sempurna dari obat. Sifat dari bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih suatu metode ekstraksi (Tiwari *et al.*, 2011).

2. Maserasi

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

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai keseimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani 2014).

Maserasi juga dapat dilakukan dengan pengadukan secara sinambung (maserasi kinetik). Kelebihan dari metode ini yaitu efektif untuk senyawa yang tidak tahan panas (terdegradasi karena panas), peralatan yang digunakan relatif sederhana, murah, dan mudah didapat. Namun metode ini juga memiliki beberapa kelemahan yaitu waktu ekstraksi yang lama, membutuhkan pelarut dalam jumlah yang banyak, dan adanya kemungkinan bahwa senyawa tertentu tidak dapat diekstrak karena kelarutannya yang rendah pada suhu ruang (Sarker, S.D., *et al*, 2006).

3. Fraksinasi

Ekstrak etanol merupakan campuran dari berbagai senyawa. Ekstrak etanol sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak etanol perlu dipisahkan dengan cara fraksinasi. Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama, kandungan yang satu dari golongan utama 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, semi polar akan masuk

ke pelarut semi polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (Mukhriani 2014; Tiwari *et al.* 2011).

4. Cairan penyari untuk ekstrasi

Penyarian ekstrak daun alpukat dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan difraksinasi dengan *n*-heksan, etil asetat, dan air. Penggunaan pelarut yang berbeda polaritasnya disebabkan kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam daun alpukat mempunyai polaritas yang berbeda-beda sehingga dengan dilakukan fraksinasi akan diketahui fraksi yang paling efektif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.1 Etanol. Pelarut ideal yang sering digunakan adalah alkohol atau campurannya dengan air yang merupakan pelarut pengestraksi yang mempunyai *extractive power* yang terbaik untuk hampir semua senyawa yang mempunyai berat molekul rendah seperti alkaloid, saponin dan flavonoid (Arifianti *et al.* 2014).

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

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

4.3 Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut yang mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas rendah (Wardhani & Sulistyani 2012). Etil asetat bersifat semi polar sehingga mampu menarik senyawa aglikon maupun glikon flavonoid. Etil asetat dapat digunakan sebagai pelarut karena dapat menarik

senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan triterpenoid (Putri *et al.* 2013).

4.4 Air. Air adalah pelarut universal, digunakan untuk ekstrak tanaman dengan produk aktivitas antimikroba. Air digunakan sebagai penyari karena murah, mudah diperoleh, stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah. Air melarutkan minyak menguap, glikosida, flavonoid, tanin, gula, gom, pati, protein, enzim, lilin, pektin, zat warna dan asam organik. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan karena zat ikut tersari sehingga zat lain yang tidak diperlukan mengganggu proses penyarian (Depkes 1986; Tiwari *et al.* 2011).

D. *Pseudomonas aeruginosa*

1. Definisi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Menurut Radji (2010), kedudukan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dalam sistematika bakteri sebagai berikut :

Kingdom	: Prokaryota
Division	: Protophyta
Subdivisi	: Schizomycetae
Class	: Schizomycetes
Ordo	: Pseudomonadales
Family	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Species	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

2. Morfologi

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri Gram-negatif, mempunyai flagel tunggal yang bersifat polar atau terkadang terdiri atas 2–3 flagel, dan mempunyai ukuran 0,5-1 μm x 3-4 μm . Bila ditumbuhkan pada perbenihan tanpa sukrosa bakteri ini dapat memproduksi lapisan lendir polisakarida ekstraseluler. Klasifikasi *Pseudomonas aeruginosa* didasarkan pada homologi RNA/DNA dan karakteristik kultur lazim. *Pseudomonas aeruginosa* sering terdapat pada flora normal usus dan kulit (Jawetz dkk, 2012).

Pseudomonas aeruginosa merupakan patogen utama bagi manusia. Bakteri ini kadang-kadang mengkoloni pada manusia dan menimbulkan infeksi apabila fungsi pertahanan inang abnormal. *Pseudomonas aeruginosa* disebut patogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi. *Pseudomonas aeruginosa* dapat juga tinggal pada manusia yang normal dan berlaku sebagai saprofit pada usus normal dan pada kulit manusia. Infeksi *Pseudomonas aeruginosa* menjadi problema serius pada pasien rumah sakit yang menderita kanker, fibrosis kistik dan luka bakar. Suhu optimum untuk pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* adalah 42⁰C. *Pseudomonas aeruginosa* mudah tumbuh pada berbagai media pembiakan karena kebutuhan nutrisinya sangat sederhana. Koloni yang dibentuk halus bulat dengan warna fluoresensi yang kehijau-hijauan.

3. Patogenesis

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri oportunistik. Perjalanan penyakit infeksi bakteri ini tentunya didahului oleh penurunan kondisi atau kekebalan tubuh penderita. Infeksi yang disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* umumnya bersifat invasif dan toksigenik (Radji 2010). Tahapan infeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terdiri atas penempelan bakteri dan kolonisasi, invasi lokal, dan penyebaran bakteri melalui sistem peredaran darah. Namun demikian, tahapan infeksi tersebut tidak harus dilalui semua karena proses infeksi dapat berhenti di setiap tahap, bergantung pada sifat dan kondisi penderita (Radji 2010). *Pseudomonas aeruginosa* memproduksi sitotoksin dan protease (misalnya eksotoksin A dan S, hemolisin, dan elastase). Isolat dari pasien fibrosis kistik menghasilkan alginat polisakarida. Hal ini memungkinkan terbentuknya mikrokoloni di mana organisme terlindungi dari opsonisasi, fagositosis, dan antibiotik. Alginat, pili, dan protein membran luar memerantarai penempelan. Produksi alginat berhubungan dengan kerentanan yang berlebihan terhadap antibiotik, defisiensi LPS, non-motilitas, dan penurunan produksi eksotoksin (Stephen & Kathleen 2007).

E. Mekanisme Antibakteri

1. Menghambat metabolisme sel mikroba

Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam p-Aminobenzoate (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat nonfungsional, sehingga kebutuhan akan asam folat tidak terpenuhi, hal ini bisa menyebabkan bakteri mati (Gunawan *et al* 2009).

2. Menghambat sintesis dinding sel mikroba

Dinding sel bakteri terdiri dari polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Gunawan *et al.* 2009). Menurut Juliantina (2008) alkaloid melakukan penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel bakteri.

3. Mengganggu permeabilitas membran sel mikroba

Selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Gunawan *et al.* 2009). Menurut Utami (2013) saponin merupakan zat aktif yang dapat meningkatkan permeabilitas membran sehingga terjadi hemolisis sel. Apabila saponin berinteraksi dengan sel bakteri atau sel jamur, maka sel bakteri tersebut akan rusak atau lisis. Heinrich (2009) menyatakan bahwa senyawa flavonoid mempunyai aktivitas antibakteri dengan merusak membran dan dinding sel bakteri sehingga menyebabkan kematian.

4. Menghambat sintesis protein sel mikroba

Bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Antibakteri bekerja dalam menyebabkan kode pada mRNA yang salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein yang abnormal dan fungsional bagi sel mikroba (Gunawan *et al.* 2009).

5. Menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba

Contoh pada rifampisin yang berikatan dengan enzim polimerase RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA sel mikroba begitu juga dengan golongan kuinolon yang menghambat enzim DNA girase pada kuman yang berfungsi membentuk kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa memuat sel kuman yang kecil sekalipun (Gunawan *et al.* 2009).

F. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri suatu zat digunakan untuk mengetahui apakah zat tersebut dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri uji. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan dua metode, yaitu metode difusi dan dilusi atau pengenceran.

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode lubang/sumuran dan metode cakram kertas. Metode kertas cakram merupakan metode yang sering digunakan untuk menentukan kepekaan kuman terhadap berbagai macam obat-obatan. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Pelczar 1988).

Metode dilusi dilakukan untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) masing-masing fraksi terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Pertumbuhan bakteri yang terhambat atau kematian bakteri akibat suatu zat antibakteri dapat disebabkan oleh penghambatan terhadap metabolisme sel mikroba, sintesis dinding sel, penghambatan terhadap permeabilitas membran sel, penghambatan terhadap sintesis protein, dan penghambatan terhadap sintesis asam nukleat. Secara garis besar bakteri gram positif lebih rentan terhadap antibakteri

karena memiliki lapisan peptidoglikan pada bagian luar yang permeabel sedangkan bakteri Gram negatif memiliki membran fosfolipid yang tersusun atas polisakarida sehingga membuat dinding sel gram negatif impermeabel terhadap antibakteri (Ravikumar *et al.* 2011).

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan menggunakan metode difusi. Nilai diameter hambat adalah kemampuan dari fraksi teraktif daun alpukat untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Prasetyo 2012). Fraksi teraktif akan diujikan secara dilusi untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Hasil KBM diperoleh dengan mengamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pelarut DMSO 5% membantu melarutkan fraksi polar, semi polar, dan non polar sehingga fraksi dapat terdistribusi merata pada media. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif untuk masing-masing bakteri uji. Bakteri yang sudah digoreskan pada media selektif diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 24-48 jam. Diamati ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

G. Media

Media merupakan substrat yang diperlukan untuk menumbuhkan dan mengembang-biakan mikrob. Sebelum digunakan media harus dalam keadaan steril, artinya tidak ditumbuhi oleh mikrob lain yang tidak diharapkan.

Mikrob dapat tumbuh dan berkembang dengan baik di dalam media yang sesuai, diperlukan persyaratan tertentu, yaitu : Media harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba, media harus mempunyai tekanan osmosis, tegangan permukaan, dan pH yang dengan kebutuhan mikroba, media harus steril dan tidak mengandung mikroorganisme lain dan diinkubasi pada suhu tertentu (Radji 2011).

Berdasarkan sifatnya, media dapat dibedakan menjadi: Media umum, adalah media yang dapat digunakan untuk menumbuhkan satu atau lebih kelompok mikroba secara umum, seperti Nutrien Agar, media pengaya jika media tersebut digunakan untuk memberi kesempatan terhadap satu jenis/ kelompok mikroba untuk tumbuh dan berkembang lebih cepat dari yang lainnya yang bersama-sama dalam suatu sampel, media selektif, adalah media yang hanya dapat ditumbuhi oleh satu atau lebih mikroorganisme tertentu, tetapi akan menghambat/ mematikan jenis lainnya, media diferensial, yaitu media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba tertentu serta penentuan sifat-sifatnya, media penguji yaitu media yang digunakan untuk pengujian senyawa atau benda-benda tertentu dengan bantuan mikroba (Radji 2010).

H. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang digunakan dalam bidang mikrobiologi harus dalam keadaan steril. Steril artinya tidak ditumbuhi oleh mikroorganisme yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan merusak media atau mengganggu proses pertumbuhan mikroba. Steril akan didapatkan melalui sterilisasi yaitu suatu proses baik secara fisika, kimia, dan mekanik yang akan membunuh mikroorganisme (Waluyo 2004). Sterilisasi sangat penting pada dasarnya untuk mencegah pembusukan bahan pangan dan komunitas lainnya, mencegah kontaminasi mikroba pada biakan murni atau proses fermentasi murni, dan mencegah adanya kontaminasi pada bahan-bahan dan alat-alat yang digunakan dalam laboratorium yang memerlukan teknik biakan murni. Media agar yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklav pada suhu 121 °C selama 15 menit. Alat- alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung (Suriawiria 1985).

I. Siprofloksasin

Siprofloksasin digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram negatif, seperti *E.coli*, *P.mirabilis*, *Klebsiella sp*, *Shigella sp*, *Enterobacter*, *Haemophylus sp*, *Chlamydia sp*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas*

aeruginosa, serta bakteri Gram positif tertentu, seperti *Staphylococcus sp* dan *Streptococcus sp* (Siswandono 2008).

Siprofloksasin adalah senyawa bakterisid golongan obat fluoroquinolon. Strukturnya berhubungan dengan asam nalidixat tetapi mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih besar dan spektrum yang lebih luas dibanding asam tersebut.

Mekanisme kerja siprofloksasin adalah menghambat topoisomerase II (DNA girase) & topoisomerase IV bakteri. Inhibisi DNA girase mencegah relaksasi DNA supercoiled positif yang diperlukan untuk transkripsi & replikasi normal. Inhibisi topoisomerase IV mengganggu pemisahan kromosom DNA pasca replikasi ke dalam masing-masing sel anak selama pembelahan sel (Katzung 2007).

J. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah suatu metode untuk pemisahan kandungan dalam suatu zat. KLT merupakan suatu teknik pemisahan dengan menggunakan adsorben (fase stasioner) berupa lapisan tipis seragam yang disalutkan pada permukaan bidang datar berupa lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Pengembangan kromatografi terjadi ketika fase gerak tertapis melewati adsorben (Deinstrop & Elke 2007). Prosedur uji dengan KLT dilakukan untuk lebih menegaskan hasil yang didapat dari skrining fitokimia. Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu metode yang diharapkan dapat digunakan untuk penentuan kadar senyawa karena relatif sederhana, tidak mahal, dan bila menggunakan fase gerak yang cocok. Kelebihan KLT adalah keserabagunaan, kecepatan, dan kepekaan. Karena berfungsi sebagai penegasan, maka uji KLT hanya dilakukan untuk golongan-golongan senyawa yang menunjukkan hasil positif pada skrining fitokimia seperti alkaloid, saponin, flavonoid, steroid, tanin, dan lain-lain (Marliana *et al.* 2005; Hilmi *et al.* 2013).

K. Landasan Teori

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan penyebab utama infeksi pneumonia nosokomial dan luka bernanah, menimbulkan pus hijau kebiruan. Penyakit karena *Pseudomonas aeruginosa* dimulai dengan penempelan dan kolonisasi bakteri ini pada jaringan inang. Bakteri ini menggunakan fli untuk penempelan sel bakteri pada permukaan inang (Jawetz dkk, 2012). *Pseudomonas aeruginosa* merupakan patogen utama bagi manusia. Bakteri ini kadang-kadang mengkoloni pada manusia dan menimbulkan infeksi apabila fungsi pertahanan inang abnormal. *Pseudomonas aeruginosa* disebut patogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi.

Daun alpukat (*Persea americana* Mill) dapat menyembuhkan beberapa penyakit seperti darah tinggi, sakit kepala, nyeri saraf, nyeri lambung, obat untuk saluran napas yang bengkak, dan menstruasi yang tidak teratur. Selain itu daun alpukat (*Persea americana* Mill) berkhasiat sebagai diuretik atau peluruh kencing (Permadi 2006). Bagian organ tanaman alpukat yang banyak dimanfaatkan adalah daunnya. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa daun alpukat memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan mikroba. Kandungan kimia dari daun alpukat adalah alkaloid, flavanoid, dan saponin (Dalimartha 2008). Penelitian terdahulu menyatakan bahwa kandungan flavonoid yang terdapat dalam daun alpukat (*Persea americana* Mill) mempunyai aktivitas sebagai antifungi, antiviral dan antibakteri.

Fraksinasi merupakan pemisahan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran suatu senyawa. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan terlarut dalam pelarut polar, begitu pula senyawa-senyawa non polar akan terlarut dalam pelarut non polar.

Penentuan kepekaan bakteri terhadap antimikroba dilakukan dengan dua metode yakni difusi dan dilusi. Metode difusi dipengaruhi oleh beberapa faktor fisik dan kimia, misalnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular, dan stabilitas obat. Metode dilusi adalah metode untuk menentukan konsentrasi

minimal dari suatu antibakteri yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganismenya.

L. Hipotesis

Berdasarkan teori dan hasil penelitian terdahulu, maka dapat ditentukan hipotesis sebagai berikut :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun alpukat (*Persea americana* Mill) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, fraksi etil asetat merupakan fraksi paling aktif dari ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. .

Ketiga, dapat menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) fraksi teraktif dari ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang diperoleh dari kabupaten Sumba Barat Daya, NTT.

Sampel dalam penelitian ini adalah simplisia daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang diperoleh dari Kabupaten Sumba, NTT. Tanaman dipilih kualitas yang paling baik, yaitu segar, muda, tidak busuk, dan tidak ditumbuhi jamur.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanolik daun alpukat (*Persea americana* Mill). Variabel utama kedua adalah uji aktivitas antibakteri hasil ekstrak dan fraksi terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah untuk mempelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian adalah, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill).

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara cepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa*, kondisi laboratorium meliputi kondisi inkas, suhu inkubasi, waktu inkubasi, sterilisasi, media yang digunakan dalam penelitian, dan metode ekstraksi.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri yang dipengaruhi oleh fraksinasi daun alpukat yang dilihat dari pertumbuhan pada media uji.

3. Defenisi operasional variabel utama

Pertama, daun alpukat adalah daun dari tanaman alpukat yang diambil dari daerah Sumba Barat Daya, NTT.

Kedua, serbuk daun alpukat (*Persea americana* Mill) adalah daun yang dikeringkan, kemudian diblender sampai menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan no. 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill) adalah hasil ekstraksi dari serbuk daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang dibuat dengan cara mengekstrak serbuk dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah lapisan *n*-heksan dari ekstrak etanolik yang difraksinasi dengan *n*-heksan menggunakan corong pisah.

Kelima, fraksi etil asetat adalah lapisan etil asetat hasil fraksinasi dari residu *n*-heksan dengan pelarut etil asetat dipartisi menggunakan corong pisah.

Keenam, fraksi air adalah lapisan air hasil fraksinasi dari residu etil asetat yang difraksinasi dengan menggunakan corong pisah.

Ketujuh, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah bakteri yang diambil dari Laboratorium Universitas Setia Budi.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi yaitu mengukur luas daerah hambatan yaitu daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri. Metode dilusi adalah metode uji aktivitas antibakteri dengan membuat satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi 41,67%; 20,83%; 10,41%; 5,20%; 2,6%; 1,3%; 0,65%; 0,32%; 0,16%; 0,08%. Kontrol negatif adalah pelarut dan kontrol positif adalah antibiotik siprofloksasin.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun alpukat (*Persea americana* Mill) segar yang diambil dari daerah Sumba Barat Daya, NTT.

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

1.3 Medium uji. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium *Pseudomonas Agar*.

1.4 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah pelarut *n*-heksan, etil asetat, etanol, dan air.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat timbang analisa yang mempunyai ketelitian baca 0.1 mg dan daya muat maksimum 100 gram, inkas, ose platina, cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes, neraca analitik, pipet volume (10 ml; 15 ml; 0.5 ml), siring, pinset, inkubator, kain flannel, kapas, corong kaca, kertas cakram, mikropipet, kapas lidi steril, autoclave, kertas saring, oven binder, lampu spiritus, dan detektor sinar UV 254 nm.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi tumbuhan alpukat

Tahapan pertama penelitian ini adalah melakukan identifikasi tanaman alpukat (*Persea americana* Mill) yang berkaitan dengan morfologi tanaman alpukat yang dilakukan di bagian Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi. Identifikasi ini bertujuan untuk mencocokkan ciri makroskopis dan mikroskopis, selain itu juga berfungsi untuk mencocokkan ciri morfologi yang ada pada tanaman alpukat (*Persea americana* Mill).

2. Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk daun alpukat

Daun alpukat yang sudah disortasi basah, dicuci bersih dengan air mengalir, dikeringkan menggunakan oven 50°C yang bertujuan untuk mengurangi kadar air dan untuk mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Simplisia yang telah kering dihaluskan dengan blender kemudian diayak dengan menggunakan ayakan no. 40.

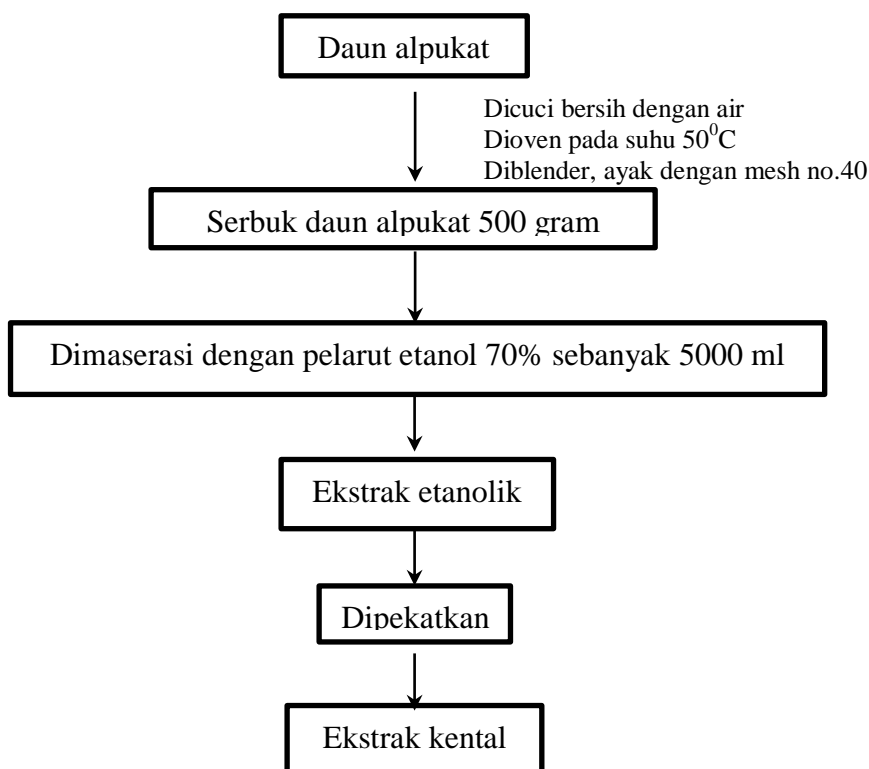
3. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan serbuk daun alpukat pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Penetapan

susut pengeringan serbuk daun alpukat dilakukan dengan menggunakan alat moisture balance, kemudian *moisture balance* ditutup dan ditunggu sampai ada bunyi pada alat sebagai tanda. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat moisture balance dicatat sebagai susut pengeringan.

4. Pembuatan ekstrak etanol 70% daun alpukat

Pembuatan ekstrak dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Serbuk daun turi sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam botol, dengan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 3750 ml. Ekstraksi dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojog berulang-ulang. Maserat yang didapatkan selama 5 hari diperas dengan kain flanel dan disaring. Residu kemudian ditambahkan etanol 1250 ml dimasukkan ke dalam botol dengan sekali diaduk dan dibiarkan selama 2 hari. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes 1986).



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol daun alpukat

5. Uji bebas etanol daun alpukat

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

6. Pengujian kandungan kimia ekstrak daun alpukat

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak daun alpukat dan juga fraksi teraktif yang ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill).

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

6.2 Identifikasi alkaloid. Ekstrak sebanyak $\pm 0,5$ g dilarutkan dengan aquadestilata. Setelah itu ditambahkan 1 ml HCl 2 N. Dibuat dalam 2 tabung. Tabung 1 ditambahkan reagen Mayer terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan. Tabung 2 ditambahkan reagen Dragendroff terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Alamsyah 2014).

6.3 Identifikasi saponin. Ekstrak sebanyak $\pm 0,5$ g ditambahkan aquadestilata, kemudian dipanaskan selama 2 sampai 3 menit. Setelah dipanaskan tunggu sampai dingin lalu kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil dan setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang menandakan adanya kandungan saponin (Ramyashree *et al.* 2012).

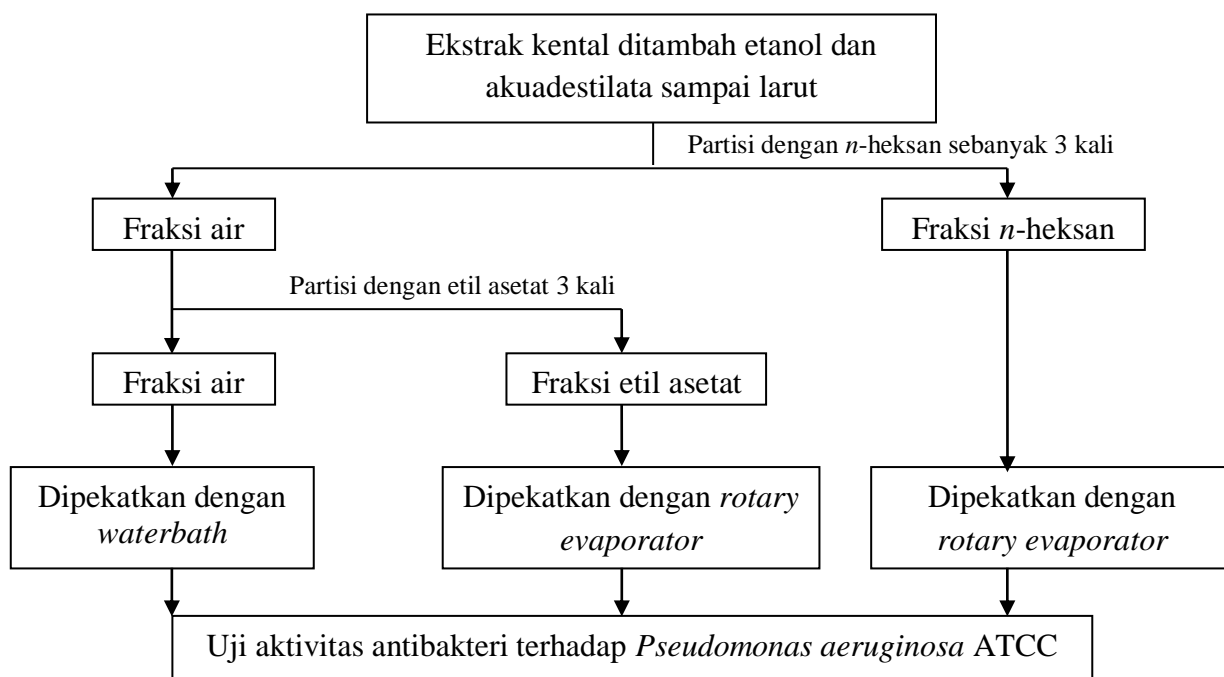
7. Fraksinasi

Fraksinasi dari ekstrak etanol daun alpukat dibuat dengan cara ditimbang dari ekstrak kental hasil maserasi. Ekstrak kental yang sudah ditimbang dilarutkan dengan etanol dan aquadestilata kemudian dipisahkan di corong pisah dengan

ditambahkan *n*-heksan, dipartisi sebanyak tiga kali. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan disebut sebagai fraksi *n*-heksan.

Residu dari fraksinasi *n*-heksan dipisahkan di corong pisah dengan ditambahkan etil asetat, dipartisi sebanyak tiga kali. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* kemudian ditimbang dan disebut sebagai fraksi etil asetat.

Residu dari fraksi etil asetat dipekatkan dengan cara dibiarkan menguap pada suhu kamar, karena masih terdapat kandungan air yang cukup banyak maka dipekatkan kembali menggunakan *waterbath* suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ lalu ditimbang dan disebut sebagai fraksi air. Skema pembuatan fraksinasi daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dapat dilihat di bawah ini.



Gambar 2. Skema diagram kerja pembuatan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak daun alpukat

8. Pembuatan suspensi bakteri uji

Mengambil biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* beberapa ose dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan BHI steril dihomogenkan. Bakteri tersebut distandarkan dengan Larutan Standart Mc

Farland 0.5. Hasil pengenceran digunakan untuk pengujian antibakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

9. Identifikasi bakteri secara uji biokimia

Suspensi *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasikan secara goresan pada medium PSA (*Pseudomonas Selektif Agar*), kemudian diinkubasi suhu 37⁰ C selama 24 jam. Koloni yang dibentuk halus bulat dengan warna fluoresensi yang kehijau-hijauan.

10. Pengujian aktivitas antibakteri

10.1 Media SIM. Biakan diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Sulfida positif bila media berwarna hitam. Uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah reagen Ehrlich. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media.

10.2 Media KIA. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dengan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Pengamatan dilakukan pada bagian lereng dan dasar media, adanya gas dan sulfide. Hasil pada bagian lereng dan dasar dapat berwarna merah yang berarti basa (ditulis K), atau kuning yang berarti suasananya asam (ditulis A), terbentuk gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfide positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+).

10.3 Media LIA. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi lisin dan sulfida. Pengamatan dilakukan pada lereng dan dasar media serta adanya sulfida. Hasil pada bagian lereng dan dasar dapat berwarna merah coklat (ditulis R), berwarna ungu yang berarti suasananya basa (ditulis K) atau berwarna kuning yang berarti suasananya asam (ditulis A), terbentuk warna hitam pada media berarti sulfida positif (S+).

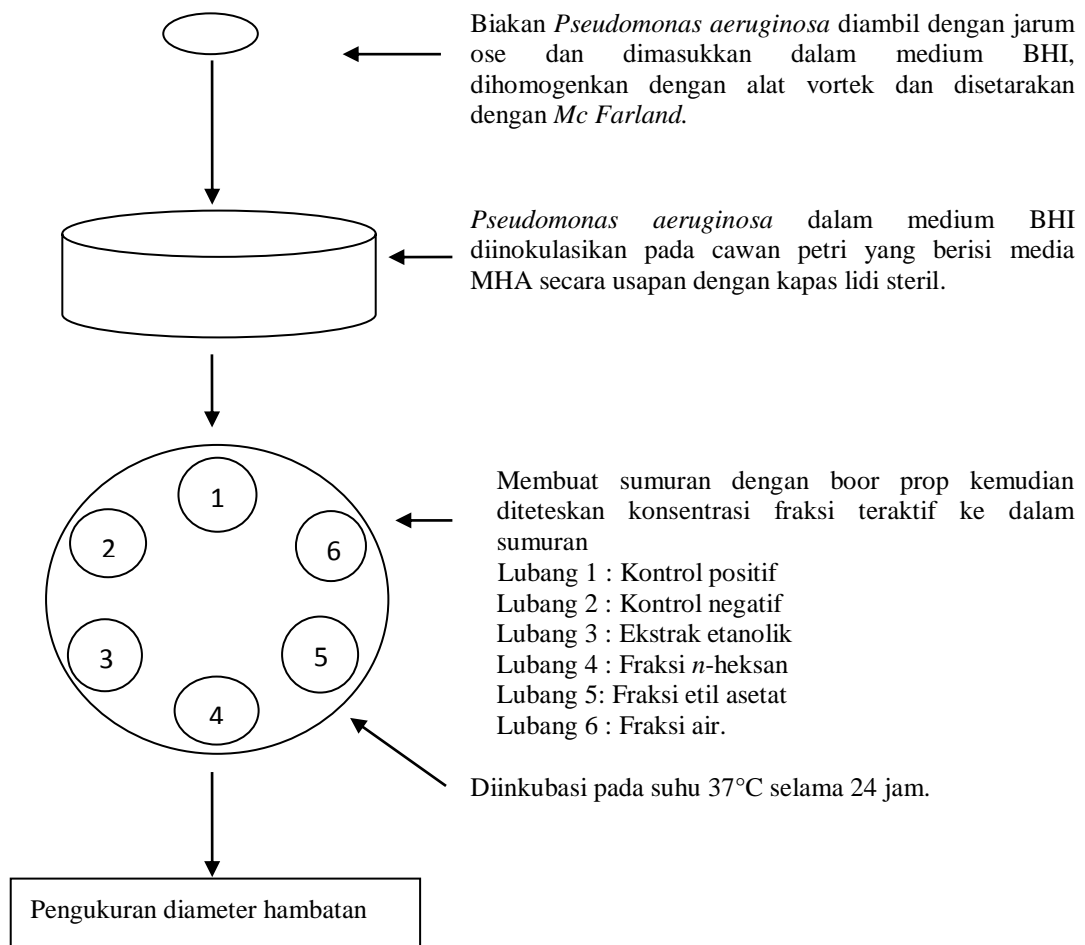
10.4 Media Citrat. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrate sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru.

10.5 Pengujian antibakteri secara difusi. Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode lubang/sumuran dan metode cakram kertas. Metode kertas cakram merupakan metode yang sering digunakan untuk menentukan kepekaan kuman terhadap berbagai macam obat-obatan. Pada cara ini, digunakan suatu cakram kertas saring (*paper disc*) yang berfungsi sebagai tempat menampung zat antimikroba. Metode difusi menggunakan cawan petri steril yang telah diisi dengan media MHA sebanyak 50 ml. Secara aseptis pada cawan petri digoresi suspensi bakteri menggunakan kapas lidi steril. Kertas cakram direndam dengan larutan stok (ekstrak dan fraksi), ditiriskan kemudian diletakan pada lempeng agar yang telah diinokulasi mikroba uji. kontrol positif adalah Siprofloksasin 31,25% dan kontrol negatif adalah DMSO 5%. Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Pelczar 1988).

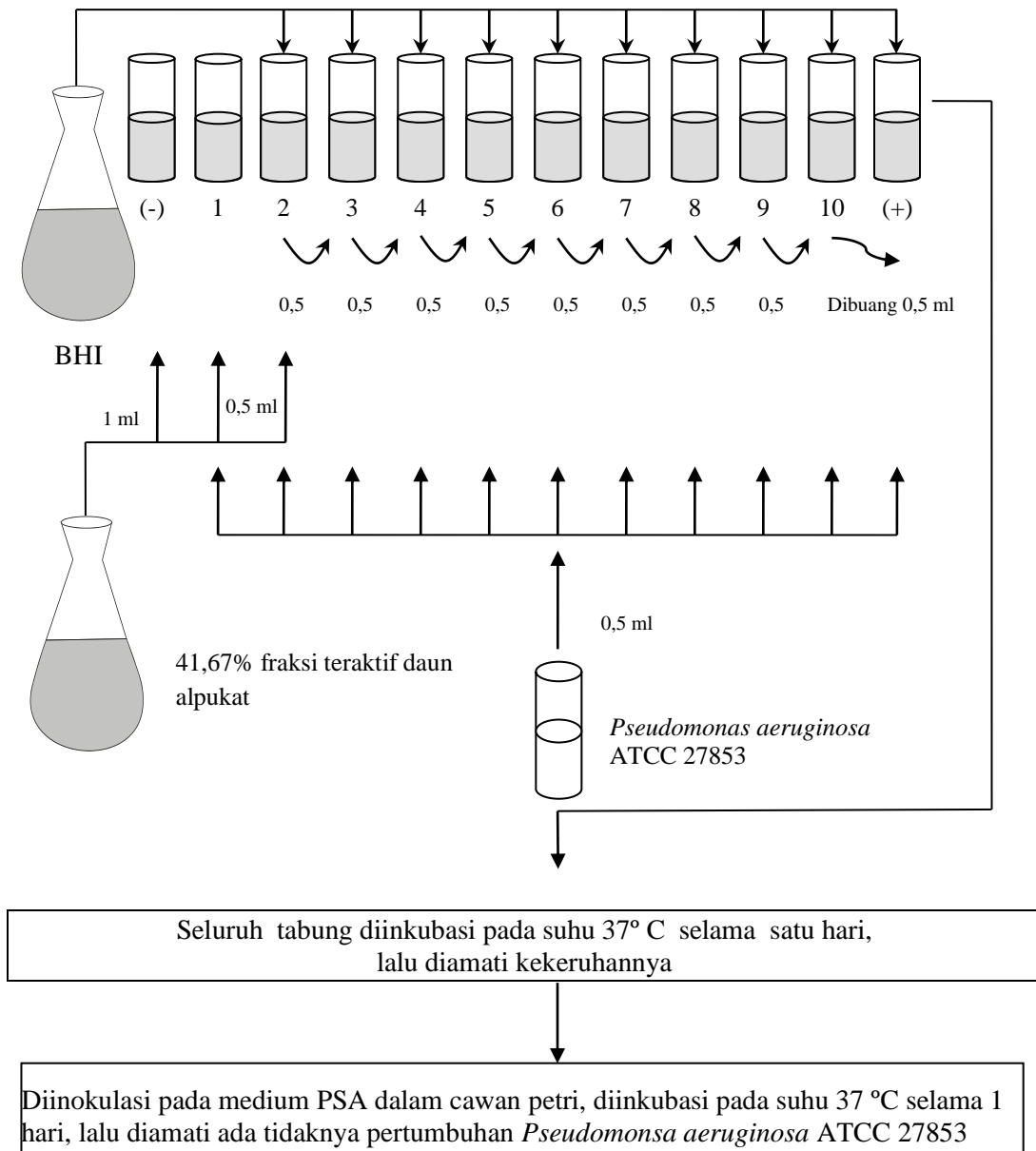
11. Pengujian antibakteri secara dilusi.

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh bakteri uji. Metode dilusi menggunakan 12 tabung steril. Konsentrasi larutan stok yang dibuat adalah 41,67%, kemudian diencerkan dengan pelarut DMSO 5%. Secara aseptis dari larutan stok tersebut dibuat deret konsentrasi di bawahnya yaitu kontrol (-); 41,67%; 20,83%; 10,41%; 5,20%; 2,6%; 1,3%; 0,65%; 0,32%; 0,16%; 0,08% dan kontrol (+). Media BHI dimasukkan 0,5 ml pada tiap tabung kecuali tabung 1. Secara aseptis, masukkan 1 ml larutan stok yang akan diuji pada tabung 1, kemudian pada tabung 2 dan 3

dimasukkan 0,5 ml larutan stok, kemudian dari tabung 2 dipipet 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung 4 begitu seterusnya sampai tabung 11 kemudian dibuang. Menambahkan 0,5 ml biakan bakteri dari tabung 2 sampai tabung 12. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif untuk masing-masing bakteri uji. Bakteri yang sudah digoreskan pada media selektif diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 24-48 jam. Diamati ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.



Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Gambar 4. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan hasil fraksinasi daun alpukat terhadap *Pseudomonasa aeruginosa* ATCC 27853

12. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis dilakukan untuk menguji fraksi aktif dalam ekstrak etanol daun alpukat. Ekstrak atau fraksi aktif dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, kemudian ditotolkan di atas lempeng kromatografi, setelah totolan kering, lempeng KLT dimasukkan dalam bejana yang sudah jenuh oleh fase gerak yang sesuai. Pengembangan dilakukan sampai jarak tertentu, kemudian dilakukan

deteksi di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm serta pereaksi tertentu. Bercak yang terdeteksi ditentukan harga Rf dan penampakan warnanya.

12.1 Identifikasi flavonoid Untuk mengetahui adanya senyawa flavonoid maka dilakukan identifikasi dengan menggunakan KLT yaitu fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan kloroform : metanol (2:3) dengan pereaksi semprot sitroborat. Bila dengan UV₂₅₄ nm memberikan peredaman, UV₃₆₆ nm berfluoresensi biru, kuning, ungu gelap (Harborne 1987).

12.2 Identifikasi alkaloid. Senyawa alkaloid diidentifikasi menggunakan KLT yaitu fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya yaitu CHCl₃ : etanol (96 : 4). Kemudian dideteksi di bawah sinar UV₂₅₄ sehingga akan memberikan warna coklat kehitaman dan UV₃₆₆ berwarna hijau. Pereaksi semprot yang digunakan yaitu Dragendorf (Budiman *et al.*, 2010).

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Hasil identifikasi tanaman alpukat (*Persea americana* Mill)

1.1 Determinasi tanaman. Tujuan dilakukan determinasi adalah untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman alpukat terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

Hasil determinasi daun alpukat berdasarkan Steenis: FLORA: 1b-2b-3b-4b-6b-7b-8b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-15b. Golongan 8.109b-119b-120b-128b-129b-135b-136b-139b-140b-142b-143b-146b-154b-155b-156b-162b-163a-164b-165a.familia 52. Lauraceae. 1a-2a. *Persea* ***Persea americana* Mill.**

1.2 Deskripsi tanaman. Deskripsi tanaman alpukat sebagai berikut : Pohon tinggi 3-10 m, akar tunggang. Batang bulat, percabangan monopodial, berkayu. Daun tunggal, tersebar, bertangkai, berjejal-jelal pada ujung ranting, bulat telur memanjang atau elips, ujung runcing, pangkal runcing, tepi rata, seperti kulit, waktu muda berambut rapat, kemudian gundul, panjang 10,1-14,7 cm, lebar 5,2-5,7 cm, permukaan atas hijau tua, mengkilap, permukaan bawah hijau muda. Bunga aktinomorfi, berkelamin dua, dalam malai yang bertangkai dan berbunga banyak, terdapat dekat ujung ranting. Tenda bunga garis tengah 1-1,5 cm, putih kuning, berbau enak, berambut, dengan tabung pendek dan enam taju yang terbentang, 3 taju terluar kecil, benang sari 12 dalam 4 lingkaran, 3 terdalam direduksi menjadi staminodia. Ruang sari 4. Staminodia orange atau coklat. Buah bentuk bola atau buah peer, panjang 5-20 cm, hijau atau hijau kuning. Biji bentuk bola, coklat, garis tengah 2,5-5 cm.

Berdasarkan hasil determinasi dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman alpukat (*Persea americana* Mill.) Gambar dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Hasil pengumpulan bahan, pengeringan, dan pembuatan serbuk daun alpukat

Daun alpukat diambil secara acak di daerah kodi Kabupaten Sumba Barat Daya, Nusa Tenggara Timur pada bulan oktober 2017. Daun alpukat yang telah dikumpulkan dibersihkan, dicuci, dan dikeringkan. Pengeringan bahan dilakukan bertujuan untuk mengurangi kadar air serta mencegah timbulnya jamur dan mikroorganisme lain yang dapat menyebabkan pembusukan dan mencegah perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu. Hasil presentase bobot kering terhadap bobot basah dapat dilihat pada table 1. Daun alpukat sebanyak 4000 gram bobot basah kemudian dikeringkan dan didapat bobot kering 1000 gram, diperoleh rendemen bobot kering terhadap bobot basah 25%. Perhitungan persentase bobot basah terhadap bobot kering dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun alpukat

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (% b/b)
4000	1000	25

3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun alpukat

Penetapan susut pengeringan daun alpukat (*Persea americana* Mill.) menggunakan alat *moisture balance*. Hasil penetapannya tercantum pada tabel di bawah ini:

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan daun alpukat

No	Bobot serbuk (gram)	Susut pengeringan (%)
1	2,00	4,5
2	2,00	4,5
3	2,00	4,0
Rata- rata		4,34

Hasil penetapan susut pengeringan daun alpukat didapatkan rata-rata sebesar 4,34 %. Susut pengeringan memenuhi syarat di mana susut pengeringan serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%, karena dengan susut pengeringan kurang dari 10% sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tidak tumbuh sehingga bahan lebih awet (Katno *et al.* 2008).

4. Hasil pembuatan ekstrak daun alpukat

Pembuatan ekstrak etanol dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi, maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Keuntungan cara penyari dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan

sederhana dan mudah diusahakan. Metode maserasi tidak menggunakan pemanasan sehingga komponen yang tidak tahan panas seperti flavonoid tetap ada di dalam ekstrak. Hasil pembuatan ekstrak kental maserasi daun alpukat dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun alpukat

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (% b/b)
500	60	12

Hasil rendemen ekstrak maserasi daun alpukat yang diperoleh adalah 12% dan hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 11.

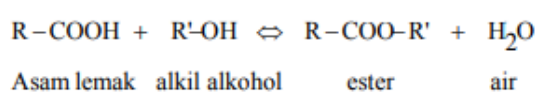
5. Hasil uji bebas etanol daun alpukat

Hasil pengujian bebas etanol ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun alpukat

Hasil	Pustaka
Tidak tercium bau ester	Tidak tercium bau ester (Kurniawati 2015)

Hasil uji ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill.) positif bebas etanol karena tidak tercium bau ester. Tujuan dilakukan uji bebas etanol pada ekstrak daun alpukat adalah untuk mencegah kesalahan pengamatan pada tahap penelitian selanjutnya yaitu pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sebab etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian. Reaksi esterifikasi adalah reaksi endotermis. Proses ini berlangsung dengan katalis asam seperti H₂SO₄. Untuk mengarahkan reaksi ke arah produk alkil ester, salah satu reaktan, biasanya alkohol diberikan dalam jumlah yang berlebihan dan air diambil selama reaksi. Umumnya pengambilan air dilakukan secara kimia, fisika dan pendorasi (Vieville et al, 1993). Esterifikasi pada dasarnya adalah reaksi yang bersifat reversibel dari asam lemak dengan alkil alkohol membentuk ester dan air adalah sebagai berikut:



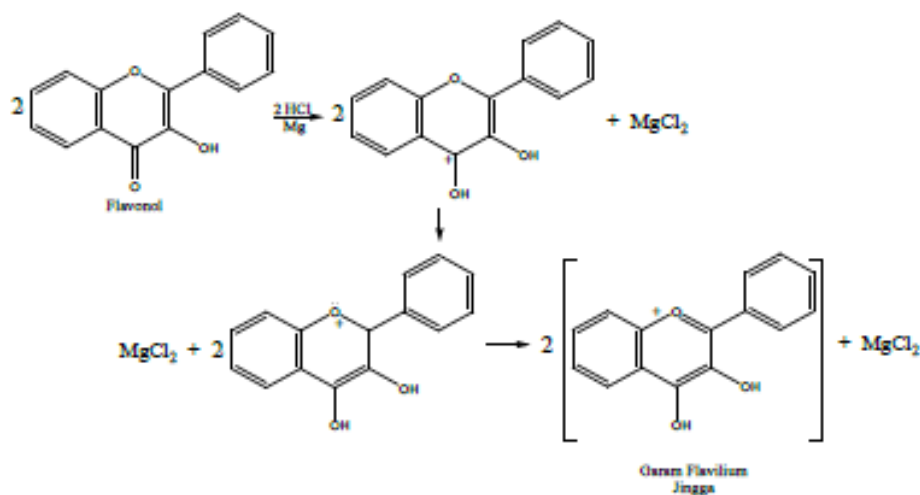
6. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun alpukat

Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun alpukat dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun alpukat

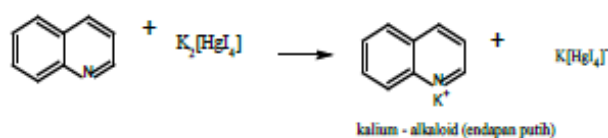
Senyawa	Hasil	Pustaka	Ket
Flavonoid	Warna kuning pada lapisan amil alkohol.	Reaksi positif ditandai dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Alamsyah <i>et al.</i> 2014).	(+)
Alkaloid	Tabung 1 → Endapan putih kekuningan (Reagen Mayers). Tabung 2 → Endapan merah kecoklatan (Reagen Dragendroff)	Terbentuk endapan menggumpal warna putih kekuningan pada reagen Mayer dan terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga kecoklatan pada reagen Dragendroff (Alamsyah <i>et al.</i> 2014).	(+)
Saponin	Terbentuk busa yang stabil + 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang.	Terbentuk busa yang stabil + 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang (Ramyashree <i>et al.</i> 2012).	(+)

Tujuan penambahan serbuk magnesium dan HCL pada pengujian flavonoid adalah untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium berwarna merah atau jingga. Pemanasan dilakukan karena sebagian besar golongan flavonoid dapat larut dalam air panas. Flavonoid merupakan senyawa yang mengandung dua cincin aromatis dengan gugus hidroksi lebih dari satu. Senyawa fenol dengan gugus hidroksil semakin banyak memiliki tingkat kelarutan dalam air semakin besar atau bersifat polar, sehingga dapat terekstrak dalam pelarut-pelarut polar. Adapun reaksi-reaksi yang terjadi antara senyawa flavonoid dengan HCL dan serbuk Mg dapat dilihat pada gambar 5



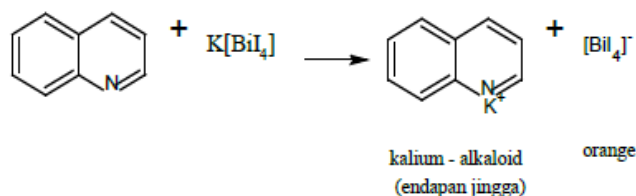
Gambar 5. Reaksi flavonoid dengan logam Mg dan HCl (Septyangsih 2010).

Prinsip dari uji alkaloid adalah reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya penggantian ligan. Hasil positif alkaloid pada uji Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Diperkirakan endapan tersebut adalah kompleks kalium-alkaloid. Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (Sangi dkk., 2008). Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat(II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Reaksi yang terjadi pada uji Mayer ditunjukkan pada gambar 6.



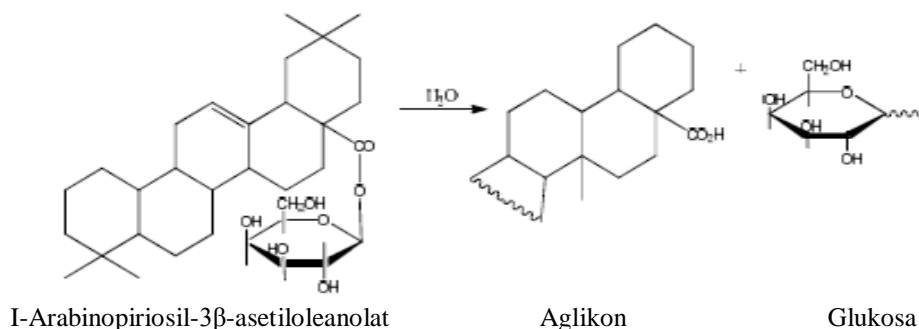
Gambar 6. Reaksi uji Mayer (Marliana dkk, 2005)

Hasil positif alkaloid pada uji Dragendorff juga ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning (jingga). Endapan tersebut adalah kalium alkaloid. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam. Reaksi pada uji Dragendorff ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Reaksi uji Dragendorff

Timbulnya buih pada pengujian saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Reaksi yang terjadi saat uji saponin ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi hidrolisis saponin dalam air

Hasil gambar identifikasi senyawa kimia ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dapat dilihat pada lampiran 5.

7. Hasil fraksinasi ekstrak daun alpukat

Penyarian awal yang dilakukan adalah maserasi dengan pelarut etanol 70%. Pelarut etanol 70 % menyari hampir keseluruhan kandungan simplisia, baik non polar, semi polar maupun polar, kemudian dilanjutkan fraksinasi. Senyawa non polar akan terekstraksi dalam pelarut *n*-heksan, senyawa semi polar akan terekstraksi dalam pelarut etil asetat sehingga akan mudah memperkirakan bahan aktif yang dapat digunakan sebagai antibakteri.

7.1 Fraksi *n*-heksan. Hasil sediaan ekstrak maserasi yang telah didapatkan ditimbang kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut non polar (*n*-heksan), diekstraksi 3 kali dengan pelarut *n*-heksan masing-masing 75 ml, kemudian fraksi *n*-heksan yang didapat diuapkan dan dipekatkan. Residu yang didapat dilakukan fraksinasi lanjutan dengan pelarut etil asetat. Rendemen hasil fraksinasi fraksi *n*-heksan dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Rendemen hasil fraksinasi *n*-heksan

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%)
10,00	1,13	11,3
10,00	1,12	11,2
10,00	1,13	11,3
Rata-rata		11,2

Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat bahwa perhitungan persentase rendemen fraksinasi fraksi *n*-heksan serbuk daun alpukat didapat presentase rata-rata yaitu 11,2%. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksan serbuk daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 12.

7.2 Fraksi etil asetat. Residu ekstrak *n*-heksan dilanjutkan dengan perlakuan fraksinasi dengan pelarut semi polar (etil asetat). Residu dari ekstrak *n*-heksan diekstraksi 3 kali dengan pelarut etil asetat masing-masing sebanyak 75 ml. fraksi ini diuapkan dan residu yang didapat dilakukan pemekatan.

Tabel 7. Rendemen hasil fraksinasi etil asetat daun alpukat

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%)
10,00	1,98	19,8
10,00	1,97	19,7
10,00	1,98	19,8
Rata-rata		19,8

Berdasarkan tabel 7 dapat dilihat bahwa perhitungan prosentase rendemen fraksinasi fraksi etil asetat serbuk daun alpukat didapat prosentase rata-rata yaitu 19,8%. Perhitungan rendemen fraksi etil asetat daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 13.

7.3 Fraksi air. Residu dari ekstrak etil asetat dilanjutkan dengan pemekatan sehingga didapat ekstrak kental. Etanol 70% merupakan pelarut serbaguna yang dapat melarutkan senyawa-senyawa polar, semi polar, dan non polar. Rendemen fraksi air hasil fraksinasi daun alpukat dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Rendemen hasil fraksi air dari daun alpukat

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (% b/b)
10,00	2,78	27,8
10,00	2,78	27,8
10,00	2,77	27,7
Rata-rata		27,8

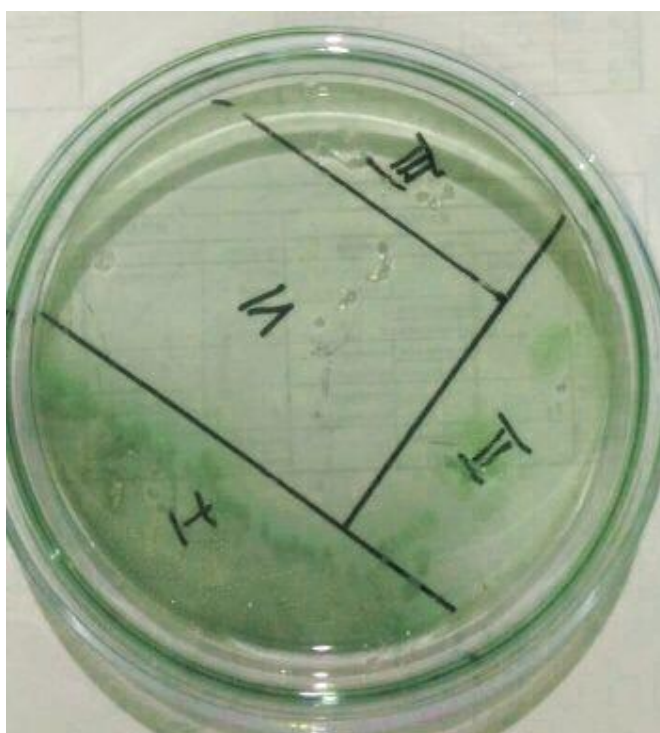
Berdasarkan tabel 8 dapat dilihat bahwa perhitungan prosentase rendemen fraksi air didapat prosentase rata-rata yaitu 27,8%. Perhitungan rendemen fraksi air daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 14.

8. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dalam biakan murni diambil masing-masing satu ose dan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 10 mL media BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Suspensi yang telah diencerkan dibandingkan dengan larutan standar Mc Farland 0,5 sampai didapat kekeruhan yang sama. Pembuatan suspensi bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah bakteri.

9. Hasil identifikasi bakteri uji

9.1 Identifikasi bakteri secara goresan. Identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, biakan *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasi pada media *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA) dan diinkubasi selama 24 jam suhu 37⁰C. Penampakan koloni yang terjadi yaitu halus, bulat dengan warna fluoresensi yang kehijau-hijauan. Pigmen pioverdin dapat terbentuk disebabkan oleh adanya magnesium klorida dan kalium sulfat yang terkandung dalam media PSA (Anonim 2011)



Gambar 9. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara inokulasi

9.2 Identifikasi bakteri uji secara biokimia. Hasil identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara biokimia dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Identifikasi uji biokimia *Pseudomonas aeruginosa*

Pengujian	Hasil	Pustaka (WHO 2003)
KIA	K / K S(-)	K / K S(-)
SIM	- ++	- ++
LIA	K / K S(-)	K / K S(-)
Citrat	+	+

Keterangan :

SIM : *Sulfida Indol Agar*

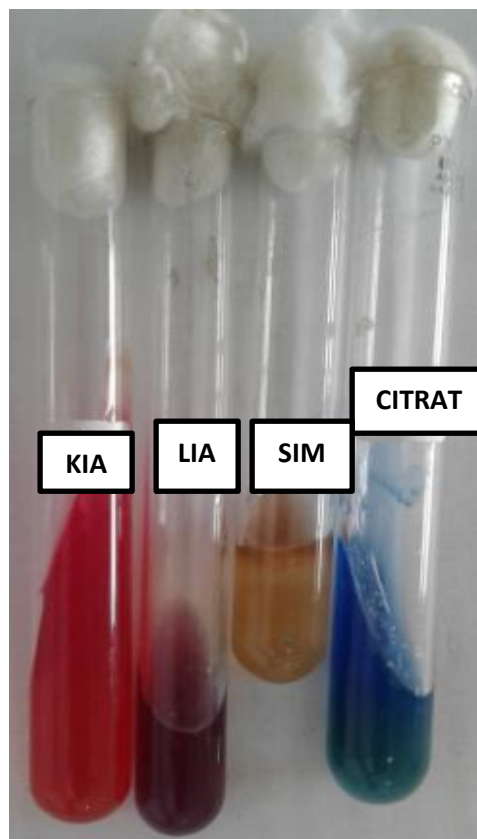
KIA : *Kliger Iron Agar*

LIA : *Lysine Iron Agar*

K : merah (pada media KIA)

A : terbentuk warna kuning

K : terbentuk warna ungu (pada media LIA)



Gambar 10. hasil identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Hasil pengujian pada media *Klinger Iron Agar* (KIA) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Pengujian dengan media KIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C 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 H₂S negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media (Harti 2015). Hal ini dikarenakan bakteri tidak dapat mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S. H₂S 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.

Medium *Lysin Iron Agar* (LIA) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfide. Pengujian dengan LIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil K/K S-. Hasil K/K artinya artinya pada lereng dan dasar media

berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin (Lindquist 2010) hal ini menyebabkan reaksi basa sehingga berwarna ungu di seluruh media, karena warna pembenihan ini mengandung bromkesol ungu dari warna coklat menjadi warna ungu. Hasil S-artinya H₂S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA kerana bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S. H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media terbentuk warna hitam.

Hasil pengujian pada media *Sulfida Indol Motilitas* (SIM) untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pengujian dilakukan setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Hasil yang didapat adalah ---, yang artinya pada uji sulfide *Pseudomonas aeruginosa* tidak dapat mereduksi thiosulfate sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide sehingga media tidak berwarna hitam. Uji indol dibuktikan dengan menambahkan tiga tetes erlich A dan B, permukaan media berwarna merah muda ini berarti uji indol positif, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* membentuk indol karena terjadi pemecahan asam amino triptofan oleh enzyme triptopanase menjadi indol dan asam pyruvat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri memakai triptopan sebagai salah satu sumber karbon sehingga terjadi reaksi antara indol dan paradimetil amino bensaldehid yang akan membentuk rasindol yang berwarna merah. Uji motilitas positif ditunjukkan dengan penyebaran di media *Sulfida Indol Motilitas* (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 *citrat* untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian dengan medium citrat setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C 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 media di atas 7,6 karena adanya ammonia yang dihasilkan yang berasal dari

monoammonium phosphate yang terdapat pada media (Sardiani *et al.*,2015). Hasil uji identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat pada lampiran 6.

10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun alpukat

10.1 Hasil pengujian antibakteri secara difusi. Hasil dari ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun alpukat dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan metode difusi dengan konsentrasi 41,67% dengan pembanding kontrol positif adalah siprofloksasin 31,25% dan kontrol negatif pelarut DMSO 5% untuk mengetahui fraksi paling aktif dengan melihat luas diameter daya hambat masing-masing fraksi.

Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi kemudian diukur diameter zona hambat sekitar sumuran yang dinyatakan dalam satuan mm. Zona yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar kertas cakram menandakan bahwa kandungan kimia daun alpukat memiliki daya hambat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hasil diameter zona hambat dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 10. Diameter zona hambat ujia aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi daun alpukat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Kandungan uji	Konsentrasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata(mm)
		I	II	III	
Ekstrak	41,67%	11	13,7	15	13,23
<i>n</i> -heksan	41,67%	26,7	25,4	22	24,7
Etil Asetat	41,67%	29	29,4	30	29,46
Air	41,67%	17,7	14	10,4	14,03
Kontro positif (+)	+	34,7	47	37,7	39,80
Kontrol negatf (-)	-	0	0	0	0

Keterangan

+ : kontrol positif (antibiotik siprofloksasin)

- : kontrol negatif (DMSO 5%)

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun alpukat daun alpukat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara difusi dapat dilihat pada lampiran 7.

Dari tabel 10 dapat dilihat pada fraksi etil asetat memiliki daya hambat lebih efektif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dibandingkan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan dan air.

10.2 Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi. Hasil fraksi etil asetat daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Seri konsentrasi yang dibuat adalah 41,67%; 20,83%; 10,41%; 5,20%; 2,6%; 1,3%; 0,65%; 0,32%; 0,16%; 0,08% dengan kontrol positif berupa bakteri uji dalam media BHI dan kontrol negatif berupa fraksi etil asetat. Hasil gambar uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara dilusi dapat dilihat pada lampiran 8. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat dilihat dari kejernihan tabung yang menunjukkan bahwa pada tabung konsentrasi tertentu dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Konsentrasi Hambat Minimum terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tidak bisa dilihat dari kejernihannya karena ditutupi oleh kekeruhan dari bagian fraksi yang digunakan. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menunjukkan adanya daya antibakteri fraksi yang dapat dilihat dari pengujian fraksi terhadap bakteri uji pada tabung kemudian diinokulasikan pada *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA) dengan tidak atau adanya pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada media PSA.

Tabel 11. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun alpukat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

No.	Konsentrasi (% b/v)	Fraksi Etil Asetat		
		I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	50	-	-	-
3	25	-	-	-
4	12,5	-	-	-
5	6,25	+	+	+
6	3,12	+	+	+
7	1,56	+	+	+
8	0,78	+	+	+
9	0,39	+	+	+
10	0,19	+	+	+
11	0,09	+	+	+
12	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :

(-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : Ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-) : Larutan stok (fraksi)

Kontrol (+) : Suspensi bakteri

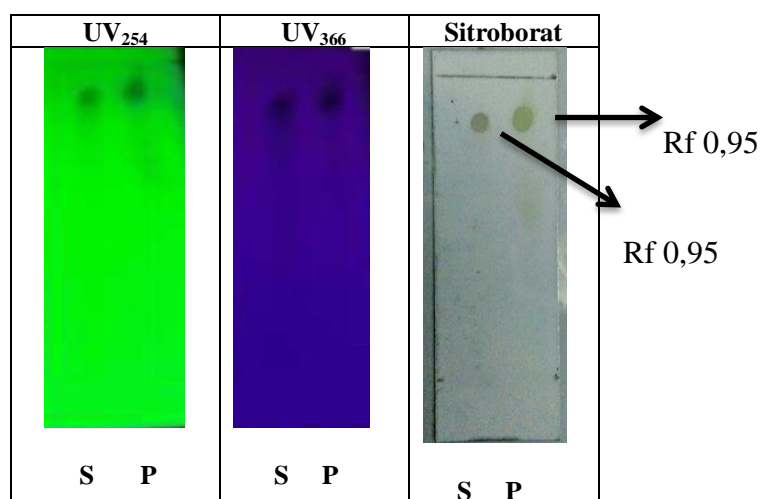
Tabung no. 2-11 : Larutan uji dan suspensi bakteri

Tabel 11 dapat dilihat bahwa uji aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan tiga kali pengulangan dengan konsentrasi fraksi yang dipakai yaitu 41,67%; 20,83%; 10,41%; 5,20%; 2,6%; 1,3%; 0,65%; 0,32%; 0,16%; 0,08%. Konsentrasi Bunuh Minimum fraksi etil asetat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 12,5%. Hasil uji dilusi menunjukkan bahwa konsentrasi 12,5% tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada replikasi pertama, kedua, dan ketiga. Pertumbuhan bakteri ditemukan pada konsentrasi 6,25% pada replikasi pertama, kedua, dan ketiga sehingga dapat disimpulkan Konsentrasi Bunuh Minimum fraksi etil asetat adalah 12,5%.

11. Hasil identifikasi fraksi paling aktif secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi terhadap kandungan kimia dengan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) hanya dilakukan pada fraksi etil asetat karena fraksi ini mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui beberapa senyawa antibakteri yang terkandung pada fraksi etil asetat.

11.1. Hasil identifikasi flavonoid. Uji kandungan kimia golongan flavonoid dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform:metanol (2:3) dengan pereaksi semprot sitroborat.



Gambar 11. Hasil identifikasi flavonoid fraksi etil asetat daun alpukat pada fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform:metanol (2:3)

Keterangan :

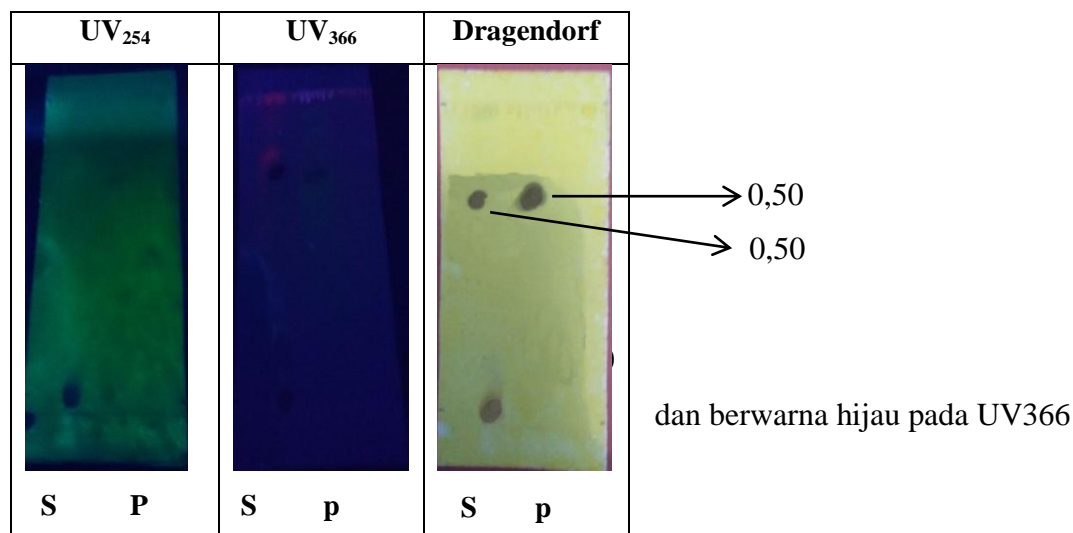
S : Sampel (fraksi etil asetat)

P : Standar (kuersetin)

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa flavonoid pada UV₂₅₄ memberikan peredaman dan berwarna ungu gelap pada UV₃₆₆. Nilai Rf bercak adalah 0,95 yang sama sama dengan pembanding kuersetin dengan nilai Rf 0,95 sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun alpukat positif mengandung flavonoid dari bercak pada lempeng KLT yang dilihat pada UV₂₅₄, UV₃₆₆ pereaksi semprot dan nilai Rf yang hampir sama dengan pembanding kuersetin.

Mekanisme kerja senyawa flavonoid yang dapat mendenaturasi protein, yaitu kerusakan struktur tersier protein sehingga protein kehilangan sifat-sifat aslinya. Terdenaturasinya protein dinding sel *Pseudomonas aeruginosa* akan menyebabkan kerapuhan pada dinding sel dan menyebabkan terganggunya proses metabolisme enzim serta penyerapan nutrisi (Parnoto *et al.* 2012). Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk kompleks protein yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Julianatina 2008).

11.2. Hasil identifikasi alkaloid. Uji kandungan kimia golongan alkaloid menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya yaitu CHCl₃:etanol (96:4) dengan pereaksi semprot yang digunakan adalah Dragendorff.



Gambar 12. Hasil identifikasi alkaloid fraksi etil asetat daun alpukat pada fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform:metanol (2:3)

Keterangan :

S : Sampel

P : Standar (rutin)

Hasil identifikasi menunjukkan bercak senyawa alkaloid pada UV₂₅₄ memberikan warna coklat kehitaman dan berwarna hijau pada UV₃₆₆. Setelah lempeng disemprot dengan pereaksi dragendorff terdapat bercak berwarna jingga yang dapat dilihat secara langsung. Bercak berwarna jingga ini menandakan adanya senyawa golongan alkaloid pada daun alpukat (Budiman *et al.* 2010). Harga Rf yang didapatkan setelah dihitung adalah 0,50. Berdasarkan Harborne (1987) nilai Rf 0,50 masuk dalam kisaran 12 alkaloid yang paling umum yaitu 0,07 - 0,62 sehingga dapat dinyatakan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun alpukat positif mengandung alkaloid dari bercak pada lempeng KLT yang dilihat pada UV₂₅₄, dan pereaksi semprot. Menurut Utami (2013) Saponin merupakan zat aktif yang dapat meningkatkan permeabilitas membran sehingga terjadi hemolisis sel. Apabila saponin berinteraksi dengan sel bakteri atau jamur maka bakteri tersebut akan rusak atau lisis.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun alpukat (*Persea americana* Mill.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun alpukat merupakan fraksi yang paling aktif sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat dari daun alpukat (*Persea americana* Mill) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah 12,5%.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut daun alpukat (*Persea americana* Mill) sebagai antibakteri pada bakteri gram negatif yang lain selain *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk dibuat sediaan yang dapat dikonsumsi masyarakat.

Ketiga, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* terhadap fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.).

DAFTAR PUSTAKA

- Alamsyah HK, Widowati I, Sabdono A. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *Sargassum cinereum* (J.G. Agardh) dari perairan pulau panjang jepara terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermidis*. *Journal Of Marine Research* 3:69-78.
- Anonim. 2011. Cetrimide Agar. Mumbay: HiMedia Laboratories. <http://himedialabs.com>
- Azidah A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap ekstrak daun *Psidium Guajava* L. *Bioscientiae* 2:31-38.
- Bonang G dan Koeswardono.1982. *Mikrobiologi Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: PT Gramedia. hlm 77-78, 176-191.
- Budiman H, Rahmawati F, Sanjaya F. 2010. Isolasi dan identifikasi alkaloid pada biji kopi robusta (*Coffea robusta* Lindl. Ex De Will) dengan cara kromatografi lapis tipis. *CERATA Jurnal Ilmu Farmasi (Journal of Pharmacy Science)* 1:57-58.
- Christianto CW, Nurwati D, Istiati. 2012. Effect of the antibacterial of avocado seed extract (*Persea americana* Mill) to grow of *Streptococcus mutans*. *Media Oral Biology Dental Jurnal*
- Cushnie TP and Lamb AJ. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 343-356
- [Departemen Kesehatan RI]. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 6-7, 10-12.
- [Departemen Kesehatan RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 3-11.
- [Departemen Kesehatan RI]. 2008. *Pengelolaan Pasca Panen Tanaman Obat*. Balai Penelitian Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Dalimartha S. 2008. *Atlas Tumbuhan Obat di Indonesia*. Jilid 5. Jakarta : Pustaka Bunda
- Fauzia dan Larasati A. 2008. Uji efek ekstrak air dari daun avokad (*Persea gratissima*) terhadap *Streptococcus mutans* dari Saliva dengan Kromatografi Lapis Tipis (TLC) dan Konsentrasi Hambat Minimum (MIC). *Majalah Kedokteran Nusantara* : 41(3):173-8.

- Gomez R. 2008. Antimicrobial activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) Mycobacterium. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 3 (2): 188194.
- Gunawan D dan Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam*. Jilid I. Jakarta: Penebar Swadaya. hlm 9-13.
- Gunawan SG, Setiabudy R, Nafrialdi, Elysabeth, editor. 2009. *Farmakologi dan Terapi*. Ed ke 5. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI. hlm 585-587, 605-608
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. penerjemah; K. Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB. hlm. 47-51.
- Harti AS. 2015. *Peran Mikrobiologi Dalam Bidang Kesehatan*. Yogyakarta: Andi Offset.
- Hilmi A, Sudjarwo, Darmawati A. 2013. Validasi metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri untuk penetapan kadar kolkisin dalam infus daun kembang sunsang (*Gloriosa superba* Linn.). *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi* 2:1-8.
- Ismiyati N dan Trilestari. 2014. Pengembangan formulasi masker ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill) sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus* untuk pengobatan jerawat. *Pharmaciana* 4:45-52
- Jawetz E. Melnick JL, dan Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 25. Jakarta: Buku Kedokteran EGC
- Juliantina F, DA, Citra B, Nirwani. 2008. *Manfaat Sirih Merah (Piper crocatum) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif*. Yogyakarta : UII press.
- Katno, Kusumadewi AW, Sutjipto. 2008. Pengaruh waktu pengeringan terhadap kadar tanin daun jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.). *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia* 1: 38-46.
- Katzung BG. 2007. *Farmakologi Dasar & Klinis*. Ed ke-10. Jakarta: Salemba Medika. hlm 80-82.
- Kurniawati E. 2015. Daya antibakteri ekstrak etanol tunas bambu apus terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Jurnal Wiyata* 2: 83-90.
- Latif A. 2012. *Obat tradisional*. Jakarta :.Buku kedokteran EGC

- Lenny S. 2006. senyawa flavonoida, fenil propanoida, alkaloid [Skripsi]. USU Repository
- Marliana SD, Suryanti V, Suyono. 2005. Skrining fitokimia dan analisis Kromatografi Lapis Tipis komponen kimia buah labu siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam ekstrak etanol. *Biofarmasi* 3:26-31.
- Mayasari, Evita. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* : Karakteristik Infeksi dan Penanganan [Skripsi]. USU Respiratory
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan* 7:361-367.
- Nilda AP, Nurhayati B, Nita S. 2011. Isolasi dan karakteristik senyawa alkaloid dari daun alpukat (*Persea americana* Mill). Pendidikan Kimia Fakultas MIPA Universitas Negeri Gorontalo.
- Nurainy F, Rizal S, Yudiantoro. 2008. Pengaruh konsentrasi kitosan terhadap aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar (sumur). *Teknologi Industri dan Hasil Pertanian* 13:117-125.
- Parnoto EN, Ma'ruf WF, Pringgenis D. 2012. Kajian aktivitas bioaktif ekstrak teripang pasir (*Holothuria scabra*) terhadap jamur *Candida albicans*. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan* 1:1-8.
- Pelczar, M.J.,E.S. Chan. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Edisi ke-2*. Jakarta. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia
- Prasetyo H. 2012. aktivitas antibakteri dan bioautografi fraksi semipolar ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis* [Skripsi]. Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Putri WS, Warditiani NK, Larasanty LPF. 2013. skrining fitokimia ekstrak etil asetat kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) [Skripsi]. Bali: Universitas Udayana. hlm 56-60.
- Radji M. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC
- Ramyashree M, Krishna Ram H, Shivabasavaiah. 2012. Ethnomedicinal value of opuntia elatior fruits and its effects in mice. *Journal of Pharmacy Research* 8: 4554-4558.
- Ravikumar S, Syed A, Ramu A, Ferosekhan M. 2011. Antibacterial activity of chosen mangrove plants against bacterial specified pathogens. *World Applied Sciences Journal* 14: 1198- 1202.

- Sardiani N *et al.* 2015. Potensi tunikata *Rhopalaea Sp* sebagai sumber inokulum bakteri *Endosymbion* penghasil antibakteri. *Jurnal Alam dan Lingkungan* Vol.6 No.11
- Septyaningsih, D. 2010. isolasi dan identifikasi komponen utama ekstrak biji buah merah (*Pandanus conoideus* lamk) [Skripsi]. Surakarta : Universitas Sebelas Maret.
- Siswandono. 2008. *Kimia Medisinal*. Edisi ke 2. Surabaya: Airlangga University Press (Hal : 134)
- Sudaryono, Agus. 2011. penggunaan tanaman betadin (*Jatropha multifida L.*) untuk meningkatkan jumlah trombosit pada *Mus musculus* [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Suharto MAP, Edy HJ, Dumanauw JM. 2012. Isolasi dan identifikasi senyawa saponin dari ekstrak methanol batang pisang ambon (*Musa paradisiaca var. sapientum L.*). *Pharmacon* 1: 89.
- Sujata VB, Bhimsen AN, Meenakshi S. 2005. *Chemistry of Natural Product*. New delhi. Narosa Publisihing House.
- Fakultas MIPA, Universitas Mataram. 2012. Sulisitiono DA. *Flavonoid*.
- Suriawiria U. 1986. *Pengantar Umum Mikrobiologi*. Bandung : Angkasa. hal 60-65
- Herbie Tandi. 2015. *Tumbuhan Obat untuk Penyembuhan Penyakit dan Kebugaran Tubuh*. Sleman Yogyakarta : Octopus
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. 2011. Phytochemical screening and extractoin. *Internationale Pharmaceutica Sciecia* 1:98-106.
- Tiwari P, BimleshK, Mandeep K, Gurpreet K, Harleen K. 2011. Skrining fitokimia dan ekstraksi. *Internationale Pharmaceutica Scientia Jan-Maret* Vol 1 Issue 1
- Waluyo L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Edisi I. Malang : Diterjemahkan Universitas Muhammadiyah Malang
- Wardhani LK dan Sulistyani N. 2012. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* beserta profil Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 2:1-16.
- Winarsi H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Penerbit Kanisius: Yogyakarta.

Lampiran 1. Determinasi daun alpukat



No : 257/DET/UPT-LAB/10/III/2018
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Maria Teresa B
NIM : 20144312 A
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **APOKAT / *Persea americana* Mill.**

Hasil determinasi berdasarkan : Steenis : FLORA

1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9b – 10b – 11b – 12b – 13b – 14b – 15b. Golongan 8. 109b – 119b – 120b – 128b – 129b – 135b – 136b – 139b – 140b – 142b – 143b – 146b – 154b – 155b – 156b – 162b – 163a – 164b – 165a. familia 52. Lauraceae. 1a – 2a. *Persea americana* Mill.

Deskripsi :

Habitus : Pohon, tinggi 3 – 10m.
Akar : Tumpang.
Batang : Bulat, percabangan monopodial, berkayu.
Daun : Daun tunggal, tersebar, bertangkai, berjejal-jejal pada ujung ranting, bulat telur memanjang atau elips, ujung runcing, pangkal runcing, tepi rata, seperti kulit, waktu muda berambut rapat, kemudian gundul, panjang 10,1 – 14,7cm, lebar 5,2– 5,7cm, permukaan atas hijau tua, mengkilat, permukaan bawah hijau muda.
Bunga : Bunga aktinomorf, berkelamin 2, dalam malai yang bertangkai dan berbunga banyak, terdapat di dekat ujung ranting. Tenda bunga garis tengah 1 – 1,5 cm, putih kuning, berbau enak, berambut, dengan tabung pendek dan 6 taju yang terbentang, 3 taju terluar kecil, benangsari 12 dalam 4 lingkaran, 3 terdalam direduksi menjadi staminodia. Ruangsari 4. Staminodia oranye atau coklat.
Buah : Buni bentuk bola atau buah peer, panjang 5 – 20 cm, hijau atau hijau kuning.
Biji : Bentuk bola, coklat, garis tengah 2,5 – 5 cm.
Pustaka : Steenis C.G.G.J., Bloembergen S. Eyma P.J. (1978): *FLORA*, PT PradnyaParamita. Jl. KebonSirih 46.Jakarta Pusat, 1978.

Surakarta, 10 Maret 2018

Pada determinasi



Drs. Martinah Wijosoendjojo, SU

Lampiran 2. Foto Tanaman Alpukat (*Persea americana* Mill.)



Gambar 13. Tanaman alpukat



Gambar 14. Daun alpukat

Lampiran 3. Foto ekstrak dan fraksi daun alpukat



Gambar 15. Ekstrak kental daun alpukat



Gambar 16. Fraksinasi ekstrak daun alpukat

Lampiran 4. Alat penelitian**Gambar 17. Alat *moisture balance*****Gambar 18. Oven binder****Gambar 19. Rotary evaporator****Gambar 20. Autovortex**

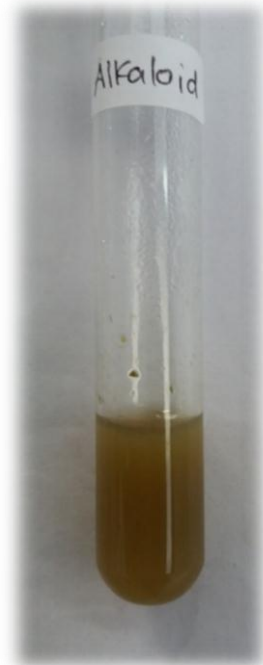
Lampiran 5. Foto uji bebas etanol dan identifikasi kandungan kimia ekstrak daun alpukat



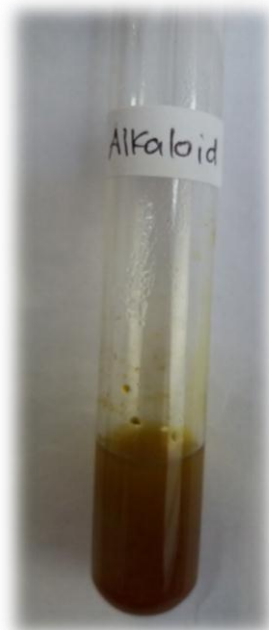
Gambar 21. Bebas etanol (reagen mayer)



Gambar 22. Flavonoid



Gambar 23. Alkaloid

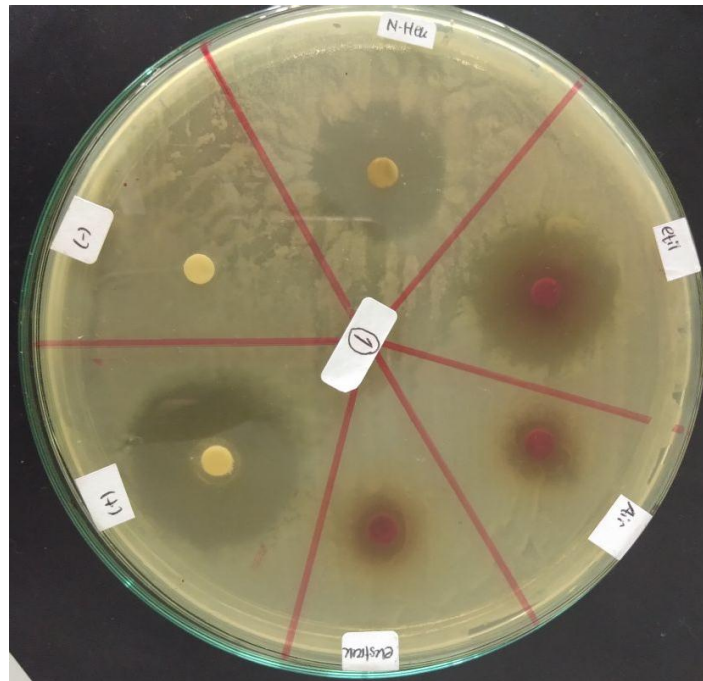


Alkaloid (reagen Drandrendrof)

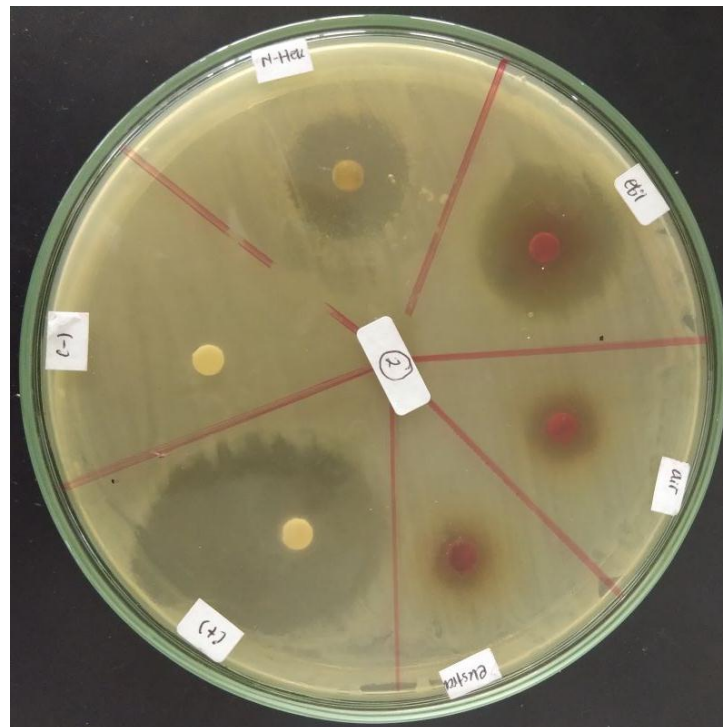


Saponin

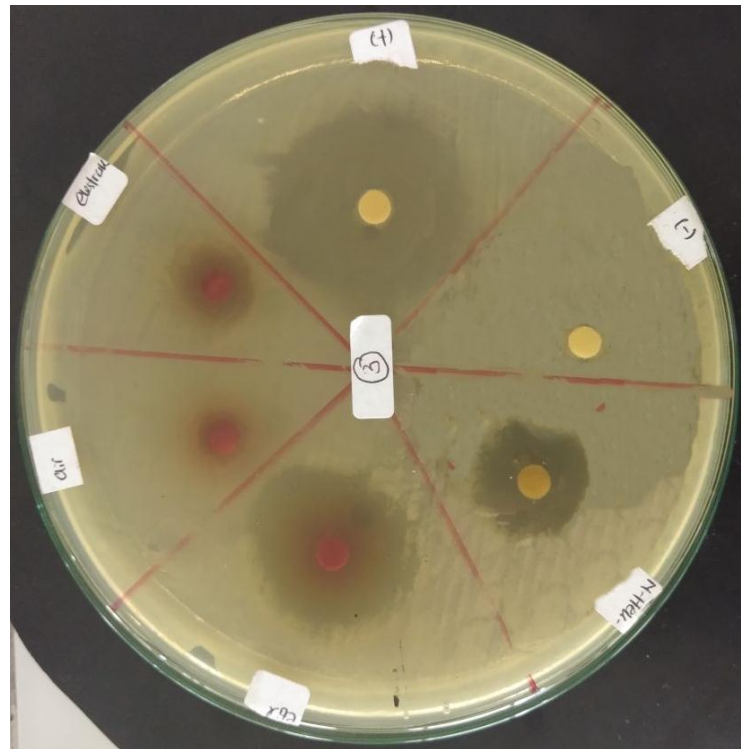
Lampiran 6. Hasil uji antibakteri ekstrak dan fraksi daun alpukat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara difusi



Gambar 24. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi (replikasi 1)



Gambar 25. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi (replikasi 2)

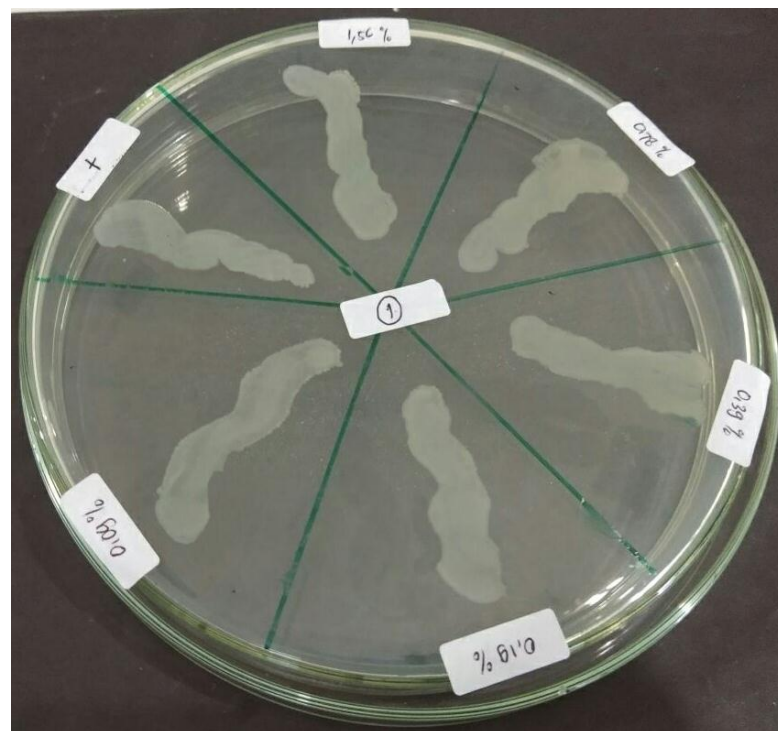


Gambar 26. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi (replikasi 3)

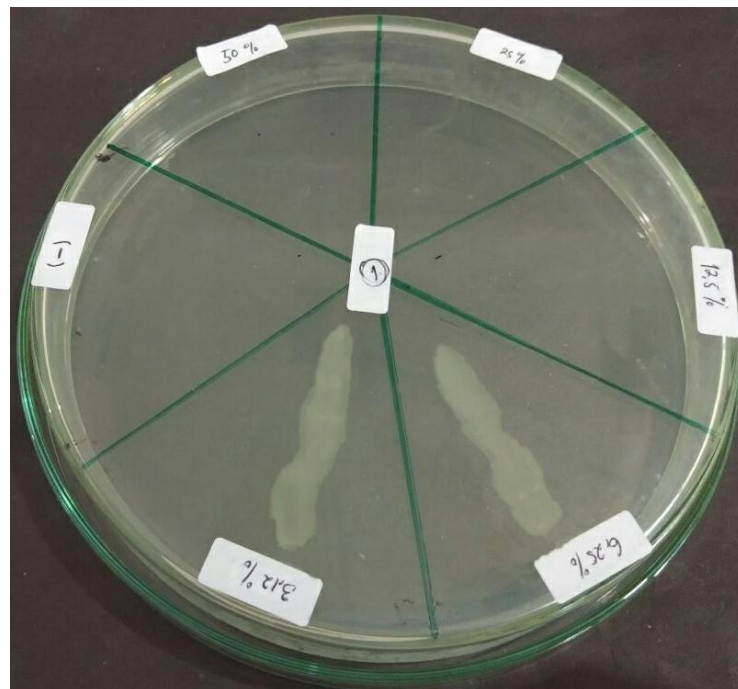
Lampiran 7. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun alpukat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara dilusi



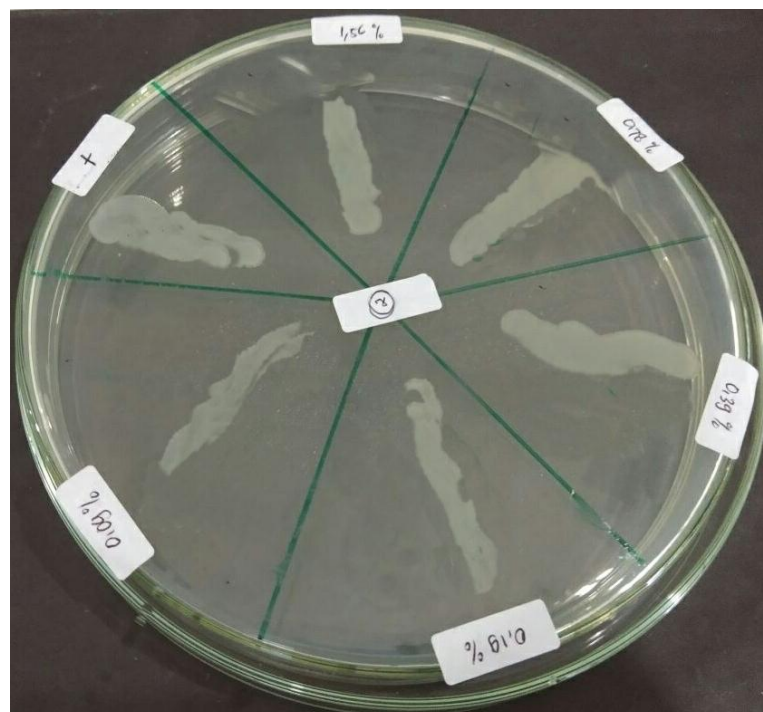
Gambar 27. Pengenceran tabung fraksi etil asetat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



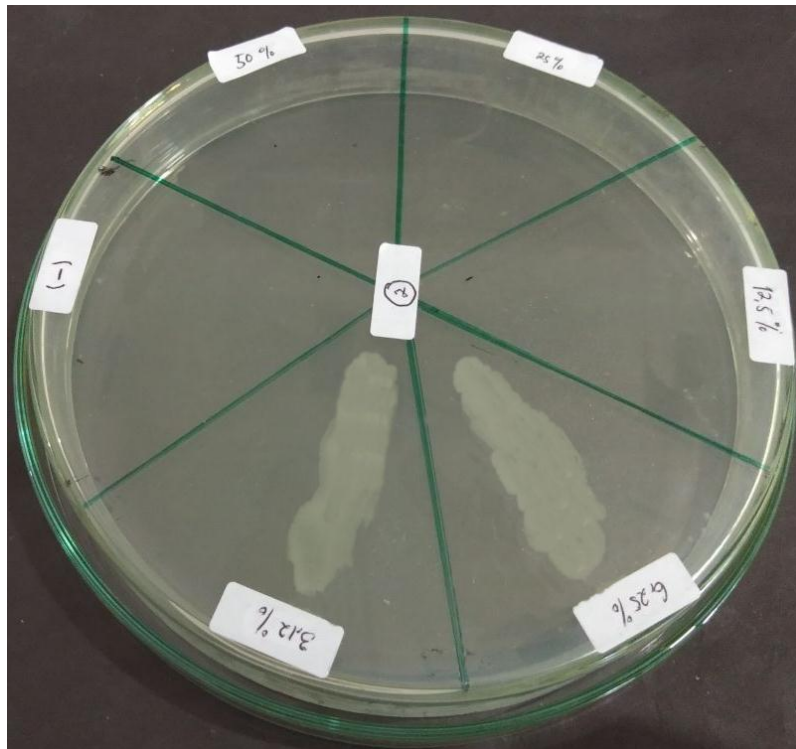
Gambar 28. Inokulasi fraksi etil asetat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (replikasi 1)



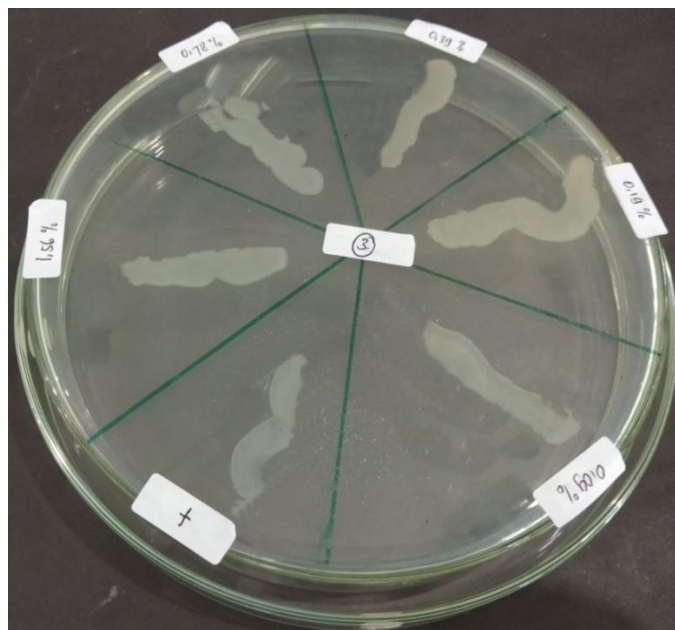
Gambar 29. Inolulasi fraksi etil asetat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
(replikasi 2)



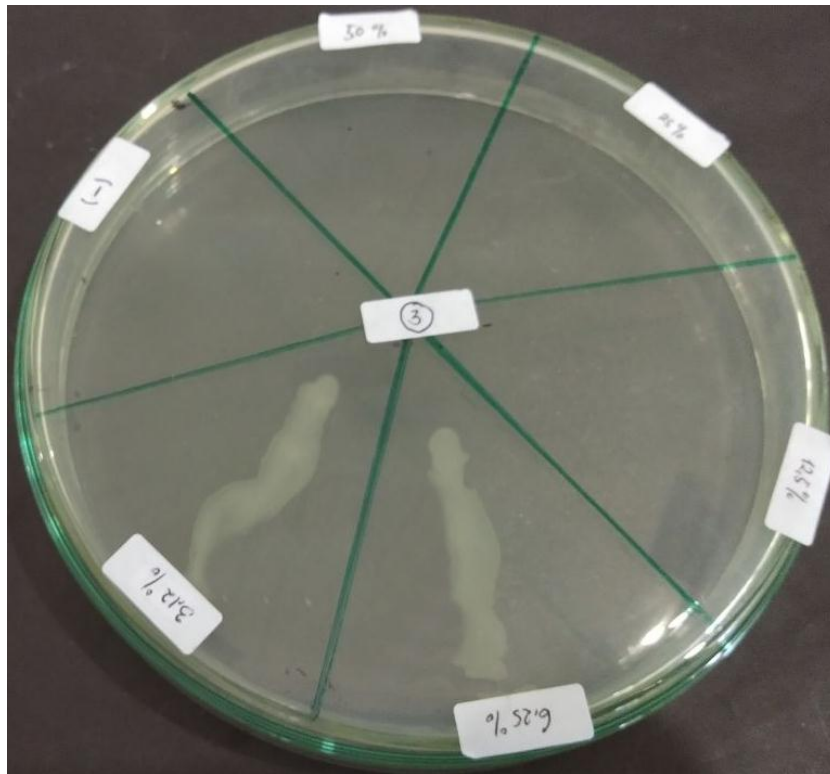
Gambar 30. Inolulasi fraksi etil asetat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
(replikasi 2)



Gambar 31. Inokulasi fraksi etil asetat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (replikasi 2)



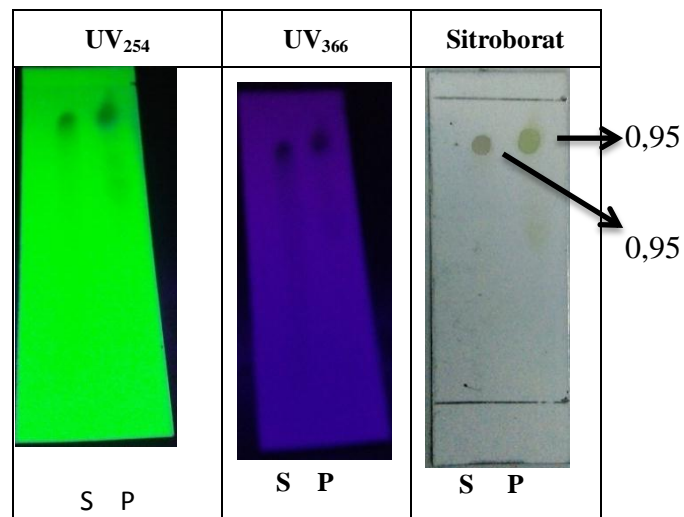
Gambar 32. Inokulasi fraksi etil asetat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (replikasi 3)



Gambar 33. Inokulasi fraksi etil asetat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (replikasi 3)

Lampiran 8. Hasil uji KLT fraksi teraktif etil asetat dan perhitungan Rf

1. Hasil identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) golongan senyawa flavonoid

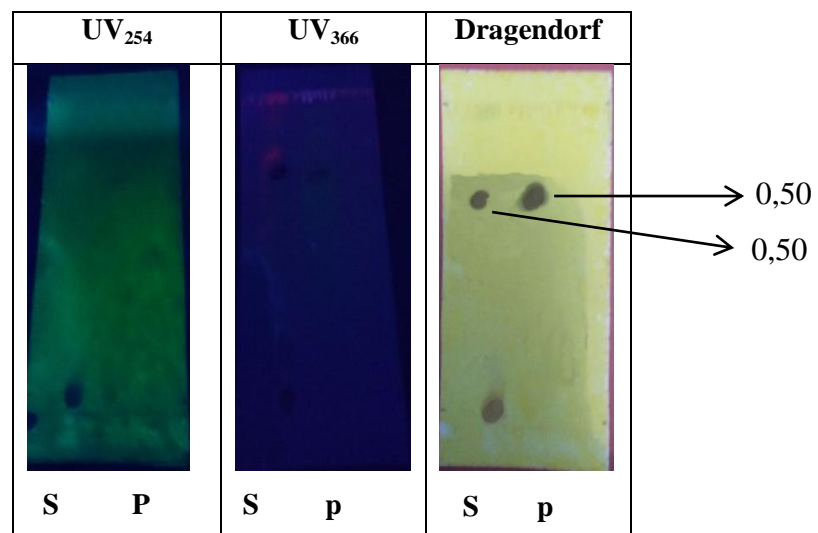


Keterangan:

S : Sampel (fraksi etil asetat)

P : Standar (kuersetin)

2. Hasil identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) golongan senyawa alkaloid



Perhitungan Rf

$$Rf = \frac{\text{jarak bercak dari awal totolan}}{\text{jarak elusi}}$$

a. Flavonoid

$$Rf \text{ quersetin} = \frac{6,3}{6,6} = 0,95$$

$$Rf \text{ sampel} = \frac{6,3}{6,6} = 0,95$$

b. Alkaloid

$$Rf \text{ quersetin} = \frac{6,3}{6,5} = 0,50$$

$$Rf \text{ sampel} = \frac{3,3}{6,5} = 0,50$$

Lampiran 9. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (% b/b)
5000	1760	35,20

Perhitungan bobot kering terhadap bobot basah adalah:

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

$$\% \text{ bobot kering} = \frac{1000 \text{ (g)}}{4000 \text{ (g)}} \times 100\% = 25\%$$

Maka persentase bobot kering terhadap bobot basah adalah 25 %.

Lampiran 10. Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.)

Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun alpukat

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (% b/b)
500	60	12

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

$$= \frac{12 \text{ g}}{500 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 12\%$$

Lampiran 11. Perhitungan rendemen fraksi *n*-heksan dari daun alpukat (*Persea americana* Mill.)

Rendemen hasil fraksinasi *n*-heksan daun alpukat

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (% b/b)
10,00	1,13	11,3
10,00	1,12	11,2
10,00	1,13	11,3
Persentase rendemen rata-rata		11,2

$$\text{Rendemen fraksi } n\text{-heksan} = \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen I} = \frac{1,13 \text{ g}}{10,00 \text{ g}} \times 100\% = 11,3 \%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{1,12 \text{ g}}{10,00 \text{ g}} \times 100\% = 11,2 \%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{1,13 \text{ g}}{10,00 \text{ g}} \times 100\% = 11,3\%$$

Dari ketiga data persentase rendemen di atas, terdapat data yang dicurigai yaitu 11,12%.

Analisis menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rumus SD} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Keterangan:

x = persentase

\bar{x} = rata-rata persentase

n = banyaknya perlakuan

SD = Standar Deviasi

Kriteria penolakan Standar Deviasi adalah $|x - \bar{x}| > 2 \text{ SD}$, \bar{x} adalah data yang dicurigai.

x	\bar{x}	$d = x - \bar{x} $	d^2
11,3	11,2	0,1	0,01
11,2		0	0
11,3		0,1	0,01
			$\Sigma = 0,01$

$$SD = \sqrt{\frac{0,01}{3-1}}$$

$$SD = 0,07$$

$$2SD = 0,14$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{11,3+11,3}{2} = 11,3$$

Data ditolak apabila $|x - \bar{x}| > 2 SD$, yang dicurigai $|11,2 - 11,3| = 0,1 < 2SD$
maka data diterima.

Persentase rata-rata rendemen fraksi *n*-heksan dari daun alpukat adalah

$$\frac{11,3+11,2+11,3}{3} = 11,2 \text{ \% b/b}$$

**Lampiran 12. Perhitungan rendemen fraksi etil asetat dari daun alpukat
(*Persea americana* Mill.)**

Rendemen hasil fraksinasi etil asetat daun alpukat

Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (% b/b)
10,00	1,98	19,8
10,00	1,97	19,7
10,00	1,98	19,8
Persentase rendemen rata-rata		19,8

$$\text{Rendemen fraksi etil asetat} = \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen I} = \frac{1,98 \text{ g}}{10,00 \text{ g}} \times 100\% = 19,8\%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{1,97 \text{ g}}{10,00 \text{ g}} \times 100\% = 19,7\%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{1,98 \text{ g}}{10,00 \text{ g}} \times 100\% = 19,8\%$$

Dari ketiga data persentase rendemen di atas, terdapat data yang dicurigai yaitu 19,7%.

Analisis menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rumus SD} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Keterangan:

x = persentase

\bar{x} = rata-rata persentase

n = banyaknya perlakuan

SD = Standar Deviasi

Kriteria penolakan Standar Deviasi adalah $|x - \bar{x}| > 2 \text{ SD}$, \bar{x} adalah data yang dicurigai.

x	\bar{x}	$d = x - \bar{x} $	d^2
19,8		0	0
19,7	19,8	0,1	0,01
19,8		0	0
			$\Sigma = 0,01$

$$SD = \sqrt{\frac{0,01}{3-1}}$$

$$SD = 0,07$$

$$2SD = 0,14$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{19,8 + 19,8}{2} = 19,8$$

Data ditolak apabila $|x - \bar{x}| > 2 SD$, yang dicurigai $|19,8 - 19,7| = 0,1 < 2SD$
maka data diterima.

Persentase rata-rata rendemen fraksi etil asetat dari daun alpukat adalah

$$\frac{19,8 + 19,7 + 19,8}{3} = 19,8\% \text{ b/b}$$

Lampiran 13. Perhitungan rendemen fraksi air dari daun alpukat (*Persea americana* Mill.)

Rendemen hasil fraksinasi air daun alpukat		
Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (% b/b)
10,00	2,78	27,8
10,00	2,78	27,8
10,00	2,77	27,7
Persentase rendemen rata-rata		27,8

$$\text{Rendemen fraksi } n\text{-heksan} = \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen I} = \frac{2,78 \text{ g}}{10,00 \text{ g}} \times 100\% = 27,8\%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{2,78 \text{ g}}{10,00 \text{ g}} \times 100\% = 27,8\%$$

$$\% \text{ Rendemen II} = \frac{2,77 \text{ g}}{10,00 \text{ g}} \times 100\% = 27,7\%$$

Dari ketiga data persentase rendemen di atas, terdapat data yang dicurigai yaitu 27,8%.

Analisis menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rumus SD} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Keterangan:

x = persentase

\bar{x} = rata-rata persentase

n = banyaknya perlakuan

SD = Standar Deviasi

Kriteria penolakan Standar Deviasi adalah $|x - \bar{x}| > 2 \text{ SD}$, \bar{x} adalah data yang dicurigai.

x	\bar{x}	$d = x - \bar{x} $	d^2
27,8		0	0
27,8	27,8	0	0
27,7		0,1	0,01
			$\Sigma = 0,01$

$$SD = \sqrt{\frac{0,01}{3-1}}$$

$$SD = 0,07$$

$$2SD = 0,14$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{27,8 + 27,8}{2} = 27,8$$

Data ditolak apabila $|x - \bar{x}| > 2 SD$, yang dicurigai $|27,8 - 27,7| = 0,1 < 2SD$
maka data diterima.

Persentase rata-rata rendemen fraksi air dari daun alpukat adalah

$$\frac{27,8 + 27,8 + 27,7}{3} = 27,8 \% \text{ b/b}$$

Lampiran 14. Pembuatan larutan dengan berbagai konsentrasi

Pembuatan stok difusi

Ekstrak dan fraksi daun alpukat

Pembuatan konsentrasi 41,67%

Ditimbang 1 gram ekstrak atau fraksi dimasukkan ke dalam vial, kemudian tambahkan DMSO 5% ad 2,4 mL

Pembuatan stok dilusi

No	Konsentrasi (%)	V1 (mL)	C1 (%)	V2 (mL)	C2 (%)	Keterangan
1	41,67	-	-	-	-	1 mL larutan stok
2	41,67	-	-	-	-	0,5 mL larutan stok
3	20,83	0,5	41,67	1	20,83	0,5 mL lar. stok + BHI ad 1mL
4	10,41	0,5	20,83	1	10,41	0,5 mL tabung 3 + BHI ad 1 mL
5	5,20	0,5	10,41	1	5,20	0,5 mL tabung 4 + BHI ad 1 mL
6	2,6	0,5	5,20	1	2,6	0,5 mL tabung 5 + BHI ad 1 mL
7	1,3	0,5	2,6	1	1,3	0,5 mL tabung 6 + BHI ad 1 mL
8	0,65	0,5	1,3	1	0,65	0,5 mL tabung 7 + BHI ad 1 mL
9	0,32	0,5	0,65	1	0,32	0,5 mL tabung 8 + BHI ad 1 mL
10	0,16	0,5	0,32	1	0,16	0,5 mL tabung 9 + BHI ad 1 mL
11	0,08	0,5	0,16	1	0,08	0,5 mL tabung 10 + BHI ad 1 mL

Keterangan :

Tabung 1 = Kontrol (-)

Tabung 3 = Konsentrasi 20,83%

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

$$V1 \cdot 41,67\% = 1 \cdot 20,83\%$$

$$V1 = \frac{20,83\%}{41,67\%}$$

$$V1 = 0,5$$

Tabung 11 dengan konsentrasi 0,08% dipipet 0,5 mL dari tabung 10 ditambah BHI sampai 1 mL, lalu dihomogenkan dan dibuang 0,5 mL.

Tabung 12 = kontrol (+) suspensi bakteri 0,5 mL + BHI 0,5 mL

Tabung 2 – 11 ditambah suspensi bakteri 0,5 mL

Lampiran 15. Formulaasi dan pembuatan media

1. Formulaasi dan pembuatan *Brain Heart Infusion* (BHI)

Infus dari otak sapi	200,0 gram
Infus dari hati sapi	250,0 gram
Protease peptone	10,0 gram
Dektrosa	2,0 gram
NaCl	5,0 gram
Dinatrium fosfate	5,0 gram
Aquadestilata ad	1000,0 mL
pH	7,4

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

2. Formulaasi dan pembuatan *Mueller Hinton Agar* (MHA)

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

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

3. Formulaasi dan pembuatan *Sulfida Indol Mortility* (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

pH $7,3 \pm 0,1$

Aquadestilata ad 1000 mL

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

4. Formulasi dan pembuatan *Kliger Iron Agar* (KIA)

Meat extract 3,0 gram

Yeast extract 3,0 gram

Peptone from casein 15,0 gram

Peptone from meat 5,0 gram

Lactose 10,0 gram

D(+) glucose 1,0 gram

Ammonium iron (III) citrate 0,5 gram

Sodium chloride 5,0 gram

Sodium thiosulfate 0,5 gram

Phenol red 0,024 gram

Agar-agar 12,0 gram

pH $7,4 \pm 0,1$

Aquadestilata ad 1000 mL

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

5. Formulasi dan pembuatan *Lysine Iron Agar* (LIA)

Peptone from maet 5,0 gram

Yeast extract 3,0 gram

D(+) glucose 1,0 gram

L-lysine monohydrochloride 10,0 gram

Sodium thioslfate 0,04 gram

Ammonium iron (III) citrate 0,5 gram

Bromocresol purple	0,02 gram
Agar-agar	12,5 gram
pH	6,7 ± 0,1
Aquadestilata	ad 1000 mL

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

6. Formulasi dan pembuatan Citrat

Ammonium dihydrogen phosphate	1,0 gram
di-potassium hydrogen phosphate	1,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
Sodium citrate	2,0 gram
Magnesium sulfate	0,2 gram
Bromothymol blue	0,08 gram
Agar-agar	12,0 gram
pH	6,9 ± 0,1
Aquadestilata	ad 1000 mL

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

7. Formulasi dan pembuatan media *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA)

Pancreatic digest of casein	1,4 gram
Potassium sulfat	10,0 gram
Agar	13,6 gram
Irgasan	25 mg
Glycerol	20,0 ml
Ph	7,0

Cara pembuatan :

1. Ditimbang bahan media PSA 45,3 gram

2. Dimasukan ke dalam erlemenyer kemudian ditambah akuadest sampai volume 1 liter
3. Ditambah glycerol sebanyak 20 ml
4. Dipanaskan medium sampai larut sempurna dengan menggunakan *hot plate*, biarkan mendidih selama 3 menit. Perlakuan pemanasan harus disertai agitasi (pengadukan)
5. Dibagikan dalam tabung reaksi secara aseptis, tiap tabung sebanyak 10 ml. Sumbatlah mulut tabung dengan kapas sampai rapat

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Ekstrak etanol, Fraksi n-heksan, Fraksi etil asetat, Fraksi air dan ciprofloksasin	15	3,00	1,464	1	5
DIAMETER	15	24,27	10,780	10	47

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekstrak etanol, Fraksi n-heksan, Fraksi etil asetat, Fraksi air dan ciprofloksasin	DIAMETER
N		15	15
Normal Parameters(a,b)	Mean	3,00	24,27
	Std. Deviation	1,464	10,780
Most Extreme Differences	Absolute	,153	,138
	Positive	,153	,138
	Negative	-,153	-,093
Kolmogorov-Smirnov Z		,592	,536
Asymp. Sig. (2-tailed)		,875	,936

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

DIAMETER

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Ekstrak etanol	3	13,33	2,082	1,202	8,16	18,50	11	15
Fraksi n-heksan	3	24,67	2,517	1,453	18,42	30,92	22	27
Fraksi etil asetat	3	29,33	,577	,333	27,90	30,77	29	30
Fraksi air	3	14,00	4,000	2,309	4,06	23,94	10	18
Ciprofloksasin	3	40,00	6,245	3,606	24,49	55,51	35	47
Total	15	24,27	10,780	2,783	18,30	30,24	10	47

Test of Homogeneity of Variances

DIAMETER

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,672	4	10	,095

ANOVA

DIAMETER

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1494,933	4	373,733	28,313	,000
Within Groups	132,000	10	13,200		
Total	1626,933	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DIAMETER

	(I) Ekstrak etanol, Fraksi n- heksan, Fraksi etil asetat, Fraksi air dan ciprofloksasin	(J) Ekstrak etanol, Fraksi n- heksan, Fraksi etil asetat, Fraksi air dan ciprofloksasin	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Ekstrak etanol	Fraksi n-heksan	-11,33(*)	2,966	,022	-21,10	-1,57
		Fraksi etil asetat	-16,00(*)	2,966	,002	-25,76	-6,24
		Fraksi air	-,67	2,966	,999	-10,43	9,10
		Ciprofloksasin	-26,67(*)	2,966	,000	-36,43	-16,90
	Fraksi n-heksan	Ekstrak etanol	11,33(*)	2,966	,022	1,57	21,10
		Fraksi etil asetat	-4,67	2,966	,544	-14,43	5,10
		Fraksi air	10,67(*)	2,966	,031	,90	20,43
		Ciprofloksasin	-15,33(*)	2,966	,003	-25,10	-5,57
	Fraksi etil asetat	Ekstrak etanol	16,00(*)	2,966	,002	6,24	25,76
		Fraksi n-heksan	4,67	2,966	,544	-5,10	14,43
		Fraksi air	15,33(*)	2,966	,003	5,57	25,10
		Ciprofloksasin	-10,67(*)	2,966	,031	-20,43	-,90
Fraksi air	Ekstrak etanol	,67	2,966	,999	-9,10	10,43	
	Fraksi n-heksan	-10,67(*)	2,966	,031	-20,43	-,90	
	Fraksi etil asetat	-15,33(*)	2,966	,003	-25,10	-5,57	
	Ciprofloksasin	-26,00(*)	2,966	,000	-35,76	-16,24	
Ciprofloksasin	Ekstrak etanol	26,67(*)	2,966	,000	16,90	36,43	
	Fraksi n-heksan	15,33(*)	2,966	,003	5,57	25,10	
	Fraksi etil asetat	10,67(*)	2,966	,031	,90	20,43	
	Fraksi air	26,00(*)	2,966	,000	16,24	35,76	

Bonferroni	Ekstrak etanol	Fraksi <i>n</i> -heksan	-11,33(*)	2,966	,034	-21,96	-,71
		Fraksi etil asetat	-16,00(*)	2,966	,003	-26,62	-5,38
		Fraksi air	-,67	2,966	1,000	-11,29	9,96
		Ciprofloksasin	-26,67(*)	2,966	,000	-37,29	-16,04
	Fraksi <i>n</i> -heksan	Ekstrak etanol	11,33(*)	2,966	,034	,71	21,96
		Fraksi etil asetat	-4,67	2,966	1,000	-15,29	5,96
		Fraksi air	10,67(*)	2,966	,049	,04	21,29
		Ciprofloksasin	-15,33(*)	2,966	,004	-25,96	-4,71
	Fraksi etil asetat	Ekstrak etanol	16,00(*)	2,966	,003	5,38	26,62
		Fraksi <i>n</i> -heksan	4,67	2,966	1,000	-5,96	15,29
		Fraksi air	15,33(*)	2,966	,004	4,71	25,96
		Ciprofloksasin	-10,67(*)	2,966	,049	-21,29	-,04
	Fraksi air	Ekstrak etanol	,67	2,966	1,000	-9,96	11,29
		Fraksi <i>n</i> -heksan	-10,67(*)	2,966	,049	-21,29	-,04
		Fraksi etil asetat	-15,33(*)	2,966	,004	-25,96	-4,71
		Ciprofloksasin	-26,00(*)	2,966	,000	-36,62	-15,38
	Ciprofloksasin	Ekstrak etanol	26,67(*)	2,966	,000	16,04	37,29
		Fraksi <i>n</i> -heksan	15,33(*)	2,966	,004	4,71	25,96
		Fraksi etil asetat	10,67(*)	2,966	,049	,04	21,29
		Fraksi air	26,00(*)	2,966	,000	15,38	36,62

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

DIAMETER

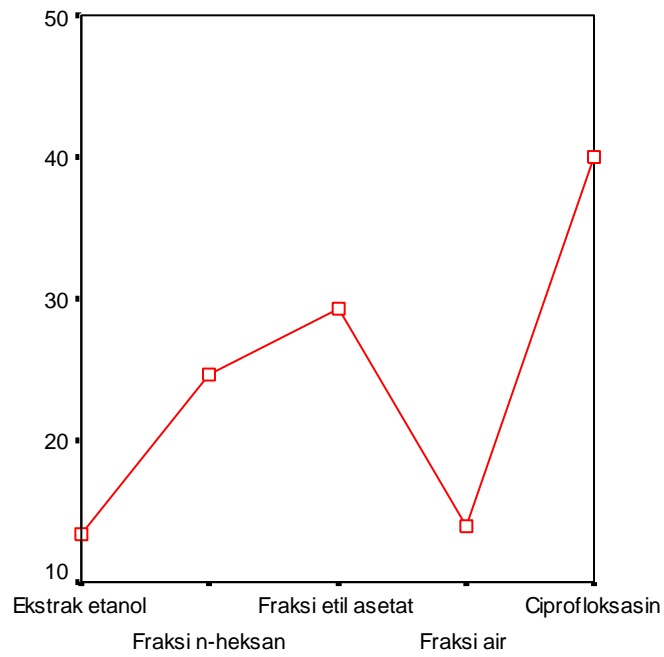
Tukey HSD

Ekstrak etanol, Fraksi <i>n</i> -heksan, Fraksi etil asetat, Fraksi air dan ciprofloksasin	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Ekstrak etanol	3	13,33		
Fraksi air	3	14,00		
Fraksi <i>n</i> -heksan	3		24,67	
Fraksi etil asetat	3		29,33	
Ciprofloksasin	3			40,00
Sig.		,999	,544	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Means Plots



Ekstrak etanol, Fraksi n- heksan, Fraksi etil asetat