

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT,  
DAN AIR DARI EKSTRAK DAUN HIJAU TANAMAN PUCUK MERAH  
(*Syzygium myrtifolium* Walp.) TERHADAP BAKTERI  
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



**Oleh:**

**Anggriani Triliani Lona**

**15113375 A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT,  
DAN AIR DARI EKSTRAK DAUN HIJAU TANAMAN PUCUK MERAH  
(*Syzygium myrtifolium* Walp.) TERHADAP BAKTERI  
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



**Oleh:**

**Anggriani Triliani Lona**

**15113375A**


**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

## PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul  
**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT,  
DAN AIR DARI EKSTRAK DAUN HJAU TANAMAN PUCUK MERAH  
(*Syzygium myrtifolium* Walp.) TERHADAP BAKTERI  
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Oleh:  
ANGGRIANI TRILIANI LONA  
15113375 A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada Tanggal: 28 Juni 2018

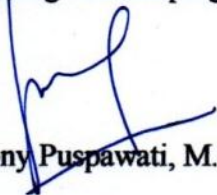
Mengetahui,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi Dekan,  
  
Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., MSc., Apt.

Pembimbing Utama



Fransiska Leviana, M.Sc., Apt.

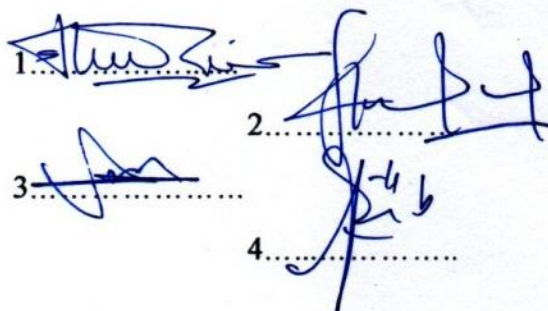
Pembimbing Pendamping,



Dra. Nony Puspawati, M.Si.

Penguji:

1. Dra. Kartinah Wiryosoendjojo, SU.
2. Dr. Titik Sunarni, S.Si., M.Si., Apt.
3. Drs. Mardiyono, M.Si.
4. Fransiska Leviana, M.Sc., Apt.



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

## **PERSEMBAHAN**

*“Dengarkanlah nasihat dan terimalah didikan, supaya engkau menjadi bijak  
dimasa depan”*

(Amsal 19:20)

*“Marilah kepada-Ku, semua yang letih lesu dan berbeban berat, Aku akan  
memberikan kelegaan kepadamu”.*

(Matius 11:28)

*Skripsi ini saya persembahkan kepada:  
Tuhan Yesus Kristus yang senantiasa  
mendengarkan, menolong, dan mengabulkan  
segala doa dan permohonan saya.  
Bapak dan mama tercinta yang selalu  
mendoakan, mendukung dengan penuh kasih  
sayang.  
Ade nando dan ade fitha christabell tersayang.  
Untuk Almamater, Bangsa, dan Negara  
tercinta.*

## **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, 28 Juni 2018



Anggriani Triliani Lona

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI EKSTRAK DAUN HIJAU TANAMAN PUCUK MERAH (*Syzygium myrtifolium* Walp.) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.

Dalam penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak, untuk itu penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
3. Fransiska Leviana, M.Sc., Apt., selaku Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing penulis, sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Dra. Nony Puspawati, M.Si., selaku Pembimbing Pendamping yang telah dengan sabar membimbing penulis, sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Bapak dan Ibu dosen penguji dan panitia skripsi yang telah memberikan masukan demi kesempurnaan skripsi ini.
6. Terimakasih kepada Pak Hendrikus, Pak Joko, Ibu Cinta, dan segenap asisten Laboratorium Mikrobiologi dan Fitokimia Universitas Setia Budi Surakarta yang telah banyak membantu.
7. Bapak dan mama tersayang yang selalu memberikan nasehat, kasih sayang, semangat, motivasi, dan doa sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan lancar. Ade Nando dan ade Bella yang selalu mendukung penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.

8. Terimakasih untuk keluarga besar Wewo, Lona, Kamlasi, Ma Ester, PD Getsemani, dan PD Imanuel, yang selalu memberikan semangat dan doa sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
9. Ayang June tersayang, sahabat-sahabat SM Town (Ade Inna, Edyck, Evi, Inn, Hell, Prisil, Tessa, Cian, Ona, mak Theo, Gitong, dan Pia), Irsha Maneak, Uni Tpoi, Eghan, Ezra, Melly, Asalia, Selvy, Jeshy Buro, dan Dila squad (Mella, Angel, Riska, Asty, Zerine, Lala, Sarah, Dede, Atalia, Jofrin) yang sudah memberikan dukungan dan doanya.
10. Rekan-rekan antibakteri (Agape, Nany, Metry, Erthien, Adinda, Mario, Andre) yang selalu membantu selama praktikum.
11. Terimakasih untuk saudara-saudari PMK KATHAROS, dan teman-teman Flobamorata Surakarta.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam menyusun skripsi ini. Kritik dan saran dari siapapun yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang mempelajarinya.

Surakarta, 28 Juni 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN .....	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
PERNYATAAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xv
ABSTRAK.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Perumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Manfaat Penelitian .....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	5
A. Tanaman Pucuk Merah ( <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.) .....	5
1. Sistematika tanaman .....	5
2. Nama lain .....	5
3. Morfologi tanaman.....	5
4. Ekologi dan penyebaran.....	5
5. Kandungan kimia .....	6
5.1. Flavonoid.....	6
5.2. Fenol.....	6
5.3. Triterpenoid.....	6
5.4. Minyak atsiri.....	7
5.5. Saponin.....	7
5.6. Alkaloid.....	7



6. Penelitian aktivitas farmakologi.....	8
B. Simplisia.....	8
1. Pengertian simplisia .....	8
2. Pengeringan simplisia .....	8
C. Metode Penyarian.....	9
1. Pengertian penyarian .....	9
2. Ekstrak.....	9
3. Maserasi .....	9
4. Fraksinasi .....	10
5. Pelarut .....	10
5.1. Etanol.....	10
5.2. Air.....	10
5.3. Etil asetat .....	10
5.4. <i>n</i> -Heksana.....	10
D. Bakteri Uji <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
1. Sismatematika <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
2. Morfologi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
3. Toksin bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
E. Antibakteri.....	12
1. Pengertian antibakteri.....	12
2. Mekanisme antibakteri .....	12
3. Amoksisilin .....	13
F. Uji Aktivitas Antibakteri.....	14
1. Metode.....	14
1.1. Metode difusi .....	14
1.2. Metode dilusi.....	14
2. Media bakteri .....	14
2.1. Media padat.....	15
2.2. Media cair.....	15
2.3. Media semi cair atau padat.....	15
3. Sterilisasi .....	15
G. Landasan Teori.....	15
H. 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. Definisi operasional variabel utama .....	20
C. Alat dan Bahan .....	21
1. Bahan .....	21
1.1. Bahan utama.....	21
1.2. Bahan kimia .....	21
1.3. Bakteri uji.....	21
1.4. Media.....	22

2. Alat.....	22
D. Jalannya Penelitian.....	22
1. Determinasi tanaman.....	22
2. Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk .....	22
3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun hijau tanaman pucuk merah ( <i>Syzygium myrtyfolium</i> Walp.).....	23
4. Pembuatan ekstrak etanolik.....	23
5. Pengujian kandungan kimia .....	23
5.1. Identifikasi triterpenoid .....	23
5.2. Identifikasi minyak atsiri.....	24
5.3. Identifikasi saponin .....	24
5.4. Identifikasi flavonoid .....	24
5.5. Identifikasi fenolik .....	24
5.6. Identifikasi alkaloid.....	24
6. Fraksinasi.....	24
7. Sterilisasi .....	25
8. Pembuatan suspensi bakteri uji .....	25
9. Identifikasi bakteri. ....	25
9.1. Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara goresan. ....	25
9.2. Pewarnaan Gram. ....	26
9.3. Identifikasi biokimia bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara katalase. ....	26
9.4. Identifikasi biokimia bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara koagulase .....	26
10. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
10.1. Uji difusi .....	26
10.2. Uji dilusi.....	27
E. Analisis Hasil .....	28
F. Skema Jalannya Penelitian.....	29
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....	32
A. Preparasi Daun Pucuk Merah.....	32
1. Hasil determinasi tanaman daun pucuk merah ( <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.) .....	32
1.1. Determinasi tanaman.....	32
1.2.Deskripsi tanaman .....	32
2. Hasil pengumpulan bahan, pengeringan, dan pembuatan serbuk daun hijau pucuk merah .....	33
3. Hasil penetapan susut pengeringan .....	33
4. Hasil pembuatan ekstrak daun hijau daun pucuk merah .....	34
5. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun hijau pucuk merah.....	34
6. Hasil fraksinasi .....	35
B. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji .....	35
C. Identifikasi Bakteri Uji <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	36

1. Hasil identifikasi bakteri secara goresan .....	36
2. Hasil identifikasi bakteri secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram .....	36
3. Hasil uji katalase .....	37
4. Hasil uji koagulase .....	38
D. Pengujian Aktivitas Antibakteri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	38
1. Uji difusi.....	39
2. Uji dilusi .....	44
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	47
A. Kesimpulan.....	47
B. Saran.....	47
 DAFTAR PUSTAKA .....	48
 LAMPIRAN .....	54

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
2. Skema pembuatan ekstrak etanolik dan fraksinasi daun hijau tanaman pucuk merah ( <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.) .....	29
3. Prosedur pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi .....	30
4. Prosedur pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi .....	31
5. Hasil identifikasi bakteri <i>S.aureus</i> ATCC 25923 secara goresan. ....	36
6. Hasil identifikasi pewarnaan Gram bakteri <i>S.aureus</i> ATCC 25923 .....	37
7. Hasil identifikasi bakteri <i>S.aureus</i> ATCC 25923 dengan uji katalase .....	38
8. Hasil identifikasi bakteri <i>S.aureus</i> ATCC 25923 dengan uji koagulase .....	38
9. Grafik rata-rata diameter zona hambat .....	41

## DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Rendemen daun hijau pucuk merah kering.....	33
2. Hasil penetapan susut pengeringan.....	33
3. Rendemen ekstrak etanolik daun hijau pucuk merah ( <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.) dengan pelarut etanol 96% .....	34
4. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi daun hijau pucuk merah.....	34
5. Rendemen fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan air dair daun hijau pucuk merah ( <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.).....	35
6. Diameter hambat uji aktivitas secara difusi terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	40
7. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun hijau pucuk merah ( <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.) terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara dilusi. ....	44
8. Hasil identifikasi kandungan kimia.....	68

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Surat keterangan determinasi tanaman pucuk merah.....	54
2. Surat keterangan identifikasi tanaman pucuk merah .....	55
3. Gambar daun hijau tanaman pucuk merah ( <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.) dan serbuk daun hijau pucuk merah ( <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.).....	56
4. Gambar alat penetapan kadar air ( <i>Moisture Balance</i> ) dan botol maserasi ..	57
5. Gambar fraksinasi daun hijau pucuk merah ( <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.) .....	58
6. Gambar alat oven dan evaporator .....	59
7. Gambar inkas, alat vortex, timbangan, dan inkubator .....	60
8. Pembuatan suspensi bakteri uji dalam media <i>Brain Heart Infusion</i> (BHI). .....	61
9. Gambar hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanolik, fraksi <i>n</i> - heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi daun hijau pucuk merah ( <i>Syzygium</i> <i>myrtifolium</i> Walp.) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara difusi. ....	62
10. Gambar hasil pengujian aktivitas antibakteri dan hasil inokulasi fraksi etil asetat daun hijau pucuk merah ( <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara dilusi. ....	65
11. Gambar hasil dan tabel identifikasi senyawa .....	66
12. Hasil prosentase bobot kering terhadap bobot basah. ....	69
13. Hasil penetapan kadar air serbuk daun hijau pucuk merah ( <i>Syzygium</i> <i>myrtifolium</i> Walp.). ....	70
14. Hasil perhitungan rendemen ekstrak etanolik dan fraksi daun hijau pucuk merah ( <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.).....	71
15. Pembuatan larutan uji ekstrak dan fraksi daun hijau pucuk merah.....	73
16. Komposisi dan pembuatan media .....	76

17. Perhitungan diameter hambat pada uji antibakteri daun hijau pucuk merah terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara difusi .....	79
18. Analisis statistik diameter zona hambat ekstrak etanolik dan fraksi daun hijau pucuk merah terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	81

## INTISARI

**LONA A.T., UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI EKSTRAK DAUN HIJAU TANAMAN PUCUK MERAH (*Syzygium myrtifolium* Walp.) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.**

Pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) merupakan salah satu tanaman hias yang bermanfaat sebagai antibakteri. Kandungan kimia daun pucuk merah yang berfungsi sebagai antibakteri adalah golongan alkaloid, triterpenoid, steroid, saponin, fenolik, flavonoid, dan minyak atsiri. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Daun hijau pucuk merah diekstraksi secara maserasi dengan pelarut etanol 96% kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan *n*-heksana, etil asetat, dan air. Ekstrak etanolik dan fraksi digunakan untuk uji antibakteri dengan metode difusi dan dilusi dengan konsentrasi 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan aktivitas teraktif pada konsentrasi 20%. Fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri paling efektif dengan diameter zona hambat 21,333 mm, dan nilai KBM adalah 5%.

**Kata kunci:** Pucuk merah, *Staphylococcus aureus*, difusi, dilusi.



## ABSTRACT

**LONA A.T., TEST ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FRACTION *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE, AND WATER FROM EXTRACT GREEN LEAF PLANTS OF PUCUK MERAH (*Syzygium myrtifolium* WALP.) AGAINST *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.**

Pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) is one ornamental plants which is beneficial sets as antibacterial. Chemical content of pucuk merah that serves as antibacterial is class of alkaloids, triterpenoid, steroid, saponin, phenolic, flavonoid, and essential oil. The purpose of this study is test antibacterial activity of fraction *n*-hexane, ethyl acetate, and water from extract green leaf plants of pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Green leaves of pucuk merah are extracted in maceration with ethanol 96% then it was fractionated by *n*-hexane, ethyl acetate, and water. Extracts and fractions were used for antibacterial tests by diffusion and dilution methods with concentrations 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%.

The results of this research indicate that extract etanolik, *n*-hexane fraction, the fraction of water, ethyl acetate fraction has antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with the most active activity at concentration 20%. Fraction of ethyl acetate has the most effective antibacterial activity with a diameter drag zone is 21.333 mm, and the KBM value is 5%

**Keywords:** Pucuk merah, *Staphylococcus aureus*, diffusion, dilution.

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Penyakit infeksi masih menempati urutan teratas penyebab penyakit dan kematian di negara berkembang. Bagi penderita, selain menyebabkan penderitaan fisik, infeksi juga menyebabkan penurunan kinerja dan produktifitas yang akan mengakibatkan kerugian materi yang berlipat-lipat. Bagi negara, tingginya kejadian infeksi di masyarakat akan menyebabkan penurunan produktifitas nasional secara umum, sedangkan di lain pihak menyebabkan peningkatan pengeluaran yang berhubungan dengan upaya pengobatan (Wahyono 2007).

Indonesia merupakan salah satu negara berkembang, dimana penyakit infeksi merupakan masalah utama kesehatan di negara ini. Proporsi kasus infeksi nosokomial di rumah sakit pemerintah adalah 1.527 orang dari 160.417 pasien beresiko. Bakteri *Staphylococcus aureus* menjadi mikroorganisme yang menyumbang 34% penyebab infeksi nosokomial (Depkes RI 2004).

*Staphylococcus aureus* adalah salah satu bakteri yang menyebabkan infeksi pada manusia dan merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik. Infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah. Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomeilitis, dan endokarditis (Ryan *et al.* 1994). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif yang bersifat patogen. Sebagian bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan flora normal pada kulit, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan pada manusia. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar (Warsa 1994).

Pengobatan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri yang resisten terhadap antibiotik perlu dilakukan penelitian untuk menemukan produk antibiotik baru yang berpotensi untuk menghambat atau membunuh bakteri yang resisten antibiotik. Salah satu alternatif yang dapat ditempuh adalah dengan memanfaatkan zat aktif pembunuh bakteri yang terkandung dalam tanaman obat.

Indonesia merupakan negara tropis yang mempunyai berbagai jenis tumbuhan obat. Lebih dari 20.000 jenis tumbuhan obat tersebar di seluruh negara ini. Sekitar 1000 jenis tanaman telah terdata dan baru sekitar 300 jenis yang sudah dimanfaatkan untuk pengobatan secara tradisional. Masyarakat Indonesia mengenal dan menggunakan tanaman berkhasiat obat sebagai salah satu upaya dalam penanggulangan masalah kesehatan yang dihadapi, jauh sebelum adanya pelayanan kesehatan formal dengan obat-obat modern (Warsa 1994).

Salah satu tanaman yang telah digunakan sebagai tanaman obat adalah *Syzygium sp.* Penelitian terhadap spesies dari genus *Syzygium* menunjukkan adanya aktivitas antibakteri seperti *Syzygium aromaticum* (cengkeh), *Syzygium cumini* L. (jamblang), *Syzygium guineense*, *Syzygium alternifolium* (Azim dkk. 2014 ; Ratman dkk. 2008). Tanaman *Syzygium sp.* yang mulai dieksplorasi aktivitasnya adalah *Syzygium myrtifolium* Walp. (pucuk merah), namun penelitian aktivitas antibakterinya masih terbatas.

Pucuk merah merupakan tanaman yang biasa dimanfaatkan sebagai tanaman hias. Pada tanaman pucuk merah terdapat kandungan senyawa kimia yang bermanfaat. Manfaat senyawa metabolit sekunder dalam beberapa bagian *Syzygium myrtifolium* Walp. yaitu sebagai pewarna alami, antioksidan, sitotoksik, antitumor, antiangiogenesis, dan antikanker (Memon dkk. 2014; Santoni dkk. 2013; Aisha dkk. 2013; Zulfikar 2017).

Senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun merah dan daun hijau tanaman pucuk merah sama, yaitu golongan alkaloid, triterpenoid, steroid, saponin, fenolik, flavonoid (Haryati dkk. 2015; Juwita dkk. 2017), dan minyak atsiri (Gea 2017; Sembiring 2015). Kandungan minyak atsiri pada daun merahnya lebih banyak dibandingkan daun hijau (Gea 2017). Perbedaan spesifik yang terdapat pada tanaman pucuk merah adalah warna merah dan hijau pada daunnya. Hal ini dipengaruhi oleh proses fotosintesis dan senyawa antosianin yang hanya terkandung pada daun merah (Salisbury & Ross 1995; Larasati 2017). Perbandingan kadar senyawa-senyawa lain dalam daun merah dan daun hijau belum banyak dilakukan, namun secara umum daun tua akan memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder lebih optimal dibandingkan daun muda.

Penelitian yang telah dilakukan oleh Haryati dkk. (2015) menunjukkan bahwa daun merah tanaman pucuk merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli aureus* dan *Staphylococcus aureus* dengan diameter zona hambat 7,63 mm, sedangkan daun hijaunya belum pernah diteliti. Daun hijau tanaman pucuk merah memiliki kandungan senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri, maka perlu dilakukan

penelitian yang membuktikan aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi dari daun hijau tanaman pucuk merah terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Fraksinasi dilakukan dengan tiga pelarut yang berbeda yaitu air, etil asetat, dan *n*-heksana. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan golongan senyawa sesuai sifat kepolaran dari pelarut. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, senyawa semipolar akan masuk ke pelarut semipolar dan senyawa nonpolar akan masuk ke pelarut nonpolar.

Uji antibakteri yang digunakan adalah metode difusi dan dilusi. Dasar penggunaan metode difusi adalah terbentuk atau tidaknya zona hambat pertumbuhan bakteri disekeliling cakram atau silinder yang bersifat antimikroba (Harminta 2004). Metode dilusi digunakan untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yaitu kadar terendah yang dapat menghambat dan membunuh bakteri (Brooks dkk. 2012; Bonang & Koeswardono 1982).

### **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas dapat dirumuskan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut:

Pertama, apakah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

Kedua, manakah dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang paling aktif menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

Ketiga, berapakah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

### **C. Tujuan Penelitian**

Pertama, untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Kedua, untuk mengetahui yang paling aktif menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 di antara ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.)

Ketiga, untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

#### **D. Manfaat Penelitian**

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah dalam upaya pengembangan obat-obat tradisional bagi ilmu pengobatan, khususnya dalam bidang farmasi dalam memanfaatkan daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang berkhasiat sebagai antibakteri.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tanaman Pucuk Merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.)**

##### **1. Sistematika tanaman**

Kedudukan tanaman pucuk merah dalam taksonomi berdasarkan Herbarium Medanese (2015) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Classis	: Dicotyledoneae
Ordo	: Myrtales
Familia	: Myrtaceae
Genus	: <i>Syzygium</i>
Spesies	: <i>Syzygium myrtifolium</i> Walp.
Sinonim	: <i>Syzygium campanulatum</i> Korth. dan <i>Syzygium oleana</i> .

##### **2. Nama lain**

Tanaman ini memiliki beberapa nama lokal yaitu pokok kelat paya (Malaysia), ubah laut (Malaysia Timur), *chinese red-wood* (*Chinese*), *wild cinnamon*, *red-lip*, *australian brush cherry*, dan *kelat oil* (Memon dkk. 2014).

##### **3. Morfologi tanaman**

Pohonnya berukuran sedang dan sering ditanam sebagai tanaman pagar karena kanopinya padat dan warna pucuknya kemerahan. Pucuk merah berupa daun tunggal berbentuk lancet; bertangkai sangat pendek hamper duduk; tumbuh berhadapan; permukaan daun bagian atas mengkilat; warna daun mengalami perubahan, ketika baru tumbuh berwarna merah menyala, kemudian berubah menjadi cokelat, lalu berubah lagi menjadi warna hijau; ukuran daun panjang  $\pm$  6 cm dan lebar  $\pm$  2 cm; pertulangan daunnya menyirip (NPB 2013).

##### **4. Ekologi dan penyebaran**

Pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) adalah tanaman hias populer dari family *Myrtaceae* dengan distribusi asli di Timur Laut India, Myanmar, Thailand, Semenanjung Malaysia, Singapura, Filipina, Sumatera, Kalimantan, dan

Filipina ditemukan tumbuh secara liar, setengah liar dan tumbuh sebagai tanaman hias (NPB 2013).

## 5. Kandungan kimia

Secara umum genus *Syzygium* mengandung metabolit sekunder berupa flavonoid, alkaloid, tanin, dan terpenoid (Mahmoud dkk. 2001). Daun merah dan daun hijau pada tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu golongan alkaloid, triterpenoid, steroid, saponin, fenolik, flavonoid (Haryati dkk. 2015; Juwita dkk. 2017), dan minyak atsiri (Gea 2017; Sembiring 2015).

**5.1. Flavonoid.** Sebagian besar senyawa flavonoid ditemukan dalam bentuk glikosida, dengan unit flavonoid terikat pada suatu gula (Lenny 2006). Marchaban dkk. (2001) dalam penelitiannya juga mengatakan bahwa flavonoid mempunyai aktivitas sebagai bakterisid dan antivirus yang dapat menekan pertumbuhan bakteri dan virus. Beberapa senyawa flavonoid yang larut dalam air, senyawa tersebut dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap ada dalam lapisan air setelah ekstrak ini dikocok dengan eter minyak bumi.

**5.2. Fenol.** Fenol meliputi aneka ragam senyawa berasal dari tumbuhan, yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua hidroksil. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena umumnya berkaitan dengan gula sebagai glikosida (Harborne 1987). Tanaman memiliki potensi yang cukup sebagai penghasil senyawa fenolik. Senyawa fenolik pada konsentrasi rendah dapat merusak membran sitoplasma dan dapat menyebabkan kebocoran inti sel, sedangkan pada konsentrasi tinggi senyawa fenol berkoagulasi dengan protein seluler. Eugenol yang banyak ditemukan pada minyak cengkeh (*Syzygium aromaticum*) adalah contoh senyawa fenolik yang bersifat bakteriostatik (Rachmawati 2011).

**5.3. Triterpenoid.** Terpenoid adalah semua senyawa yang terbentuk dari satuan isoterpen, tanpa memperhatikan gugus fungsi yang ada. Monoterpenoid khas berupa cairan tak berwarna, tidak larut dalam air, dapat disuling uap dan berbau harum (Robinson 1995). Terpenoid sebagai zat antibakteri diduga melibatkan kerusakan membran oleh senyawa lipofilik (Cowan 1999). Terpenoid

dapat bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat dan merusak porin, mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi, pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Rachmawati 2011).

**5.4. Minyak atsiri.** Minyak atsiri mudah larut dalam etanol absolut, eter, eter minyak tanah, kloroform, dan minyak lemak, tetapi sangat sedikit larutan dalam air (Voigt 1994). Minyak atsiri adalah zat berbau yang terkandung dalam tanaman. Minyak atsiri sering disebut sebagai minyak menguap, minyak eteris, atau minyak esensial karena mudah menguap pada suhu kamar dan udara terbuka. Minyak atsiri pada keadaan segar dan murni tanpa pencemar umumnya tidak berwarna, akan tetapi pada penyimpanan lama minyak atsiri dapat teroksidasi, membentuk resin dan berubah warna menjadi lebih tua (Gunawan & Mulyani 2004). Minyak atsiri juga dapat sebagai antimikroba tetapi tidak semua minyak atsiri dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Minyak atsiri bagi manusia terutama pada dosis yang tinggi atau berlebihan dapat menyebabkan depresi susunan syaraf yang disertai dengan gejala kejang dan kematian. Beberapa jenis minyak atsiri dapat digunakan sebagai bahan antiseptik eksternal dan internal, sebagai bahan analgetik, haemolitik, sedatif, stimulan untuk obat sakit perut dan sebagai obat cacing (Guenther 1987).

**5.5. Saponin.** Saponin senyawa aktif permukaan yang kuat memberikan busa bila dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menghemolisis sel darah merah. Saponin larut dalam air dan etanol tetapi tidak larut dalam eter (Robinson 1995). Saponin merupakan senyawa steroid dan glikosil terpena yang dapat larut dalam lipid dan air. Saponin bila membentuk kompleks dengan sterol, saponin akan menjadi toksik terutama pada sistem pencernaan dan merusak dinding pembuluh darah bagi manusia (Taiz & Zeiger 2002).

**5.6. Alkaloid.** Senyawa alkaloid merupakan golongan senyawa yang dari segi kimia bersifat homogen, mengandung nitrogen yang sering terdapat dalam cincin heterosiklik dan bersifat basa (Robinson 1995). Senyawa alkaloid memiliki mekanisme penghambatan bakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun



peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Permatasari dkk. 2013).

## **6. Penelitian aktivitas farmakologi**

Pada daun merah tanaman pucuk merah yang sudah diteliti terdapat kandungan senyawa *dimethyl cardamonin* (DMC) dan adanya aktivitas antikanker pada sel kanker kolon manusia (HT-29) (Memon dkk. 2014), aktivitas antikanker dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Zulfikar dkk. 2017), adanya aktivitas antibakteri (Haryati dkk. 2015), aktivitas antidiabetes (Hasti dkk. 2016), dan aktivitas hepatoprotektor (Nur 2016). Pada daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifilium* Walp.) menunjukkan adanya aktivitas antihiperurisemia (Juwita dkk. 2017).

## **B. Simplisia**

### **1. Pengertian simplisia**

Simplisia merupakan bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Depkes 1995). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum zat kimia murni. Simplisia mineral adalah simplisia yang berupa bahan pelitan atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Gunawan & Mulyani 2004).

### **2. Pengeringan simplisia**

Tujuan pengeringan adalah untuk menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang bisa menguraikan lebih lanjut kandungan zat aktif, memudahkan dalam hal pengelolaan proses selanjutnya. Pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan alat pengering. Saat pengeringan, yang perlu diperhatikan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara, waktu pengeringan dan luas permukaan bahan. Pengeringan panas sinar matahari paling banyak

digunakan di Indonesia karena lebih mudah dan murah (Gunawan & Mulyani 2004).

### **C. Metode Penyarian**

#### **1. Pengertian penyarian**

Penyarian adalah kegiatan penarikan zat dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang dicari mengandung zat aktif yang dapat larut dan zat yang tidak dapat larut. Metode penyarian yang digunakan bergantung pada wujud dan kandungan zat alam yang akan disari. Pemilihan sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus mempunyai kemampuan dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan seminimal mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel 1989).

#### **2. Ekstrak**

Ekstrak merupakan sediaan berupa kering kental, dan cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok di luar pengaruh cahaya matahari langsung. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa hal, seperti sifat dari bahan mentah obat atau simplisia dan daya penyesuaian dengan tiap metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna dari obat atau simplisia (Ansel 1989).

#### **3. Maserasi**

Maserasi merupakan cara ekstraksi yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif tersebut akan larut karena ada perbedaan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel, maka larutan yang terpekat yang didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Keuntungan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan, kerugian maserasi adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (Depkes 1986).

Selama proses maserasi, bahan direndam dalam wadah bermulut lebar, ditutup rapat dan dikocok berulang-ulang selama 2-4 hari, tetapi 5 hari telah cukup memadai (Ansel 1989).

#### 4. Fraksinasi

Suatu cara untuk memisahkan golongan utama kandungan satu dari golongan utama kandungan yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan terjadi fraksi yang berbeda. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar akan masuk ke pelarut yang bersifat nonpolar (Harborne 1987).

#### 5. Pelarut

**5.1 Etanol.** Etanol merupakan larutan serbaguna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan agar diperoleh hasil yang baik, penyarian biasanya digunakan campuran antara etanol dan air. Pelarut etanol 96% digunakan karena merupakan pelarut yang baik untuk ekstraksi pendahuluan (Harborne 1987). Etanol 96% juga memiliki kemampuan menyari dengan polaritas yang lebar mulai dari senyawa nonpolar sampai dengan polar (Saifudin *et al.* 2011).

**5.2. Air.** Air digunakan sebagai pelarut karena murah, mudah diperoleh, stabil, tidak menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah. Air melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tannin, gula, gom, pati, protein, enzim, lilin, zat warna dan asam organik (List & Schmidt 2000).

**5.3. Etil asetat.** Etil asetat merupakan pelarut semi polar, mudah terbakar, dan mudah menguap, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas. Etil asetat merupakan cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah dan larut 15 bagian air. Etil asetat dapat bercampur dalam eter, etanol, dan kloroform. Senyawa yang larut ke dalam pelarut ini adalah flavonoid (Harborne 1987).

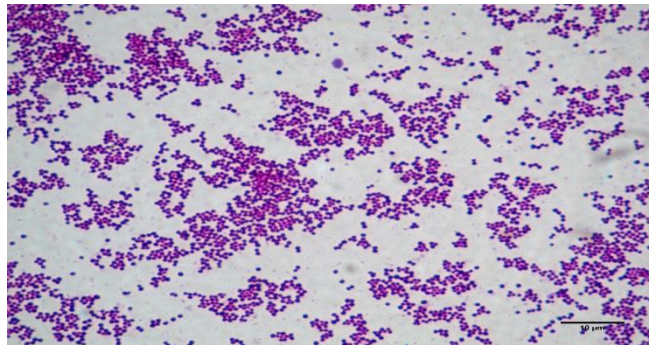
**5.4. *n*-Heksana.** Pelarut *n*-heksana merupakan pelarut nonpolar berupa cairan jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar, dan mempunyai bau seperti eter lemah atau bau seperti petroleum, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa nonpolar, misalnya golongan kandungan kimia minyak atsiri, lemak dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid dan karotenoid (Kristijono 2004).

## D. Bakteri Uji *Staphylococcus aureus*

### 1. Sistematika *Staphylococcus aureus*

Sistematika dari bakteri *Staphylococcus aureus* menurut Holt *et al.* 1994 adalah sebagai berikut:

Divisio	: Protophyta
Classis	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Micrococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>



Gambar 1. *Staphylococcus aureus*.

### 2. Morfologi bakteri *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif, berbentuk kokus dan mengeluarkan endotoksin, *Staphylococcus aureus* tidak bergerak, tidak mampu membentuk spora, fakultatif aerob, dan sangat tahan terhadap pengeringan. Bakteri ini akan mati pada suhu 60°C setelah 60 menit. *Staphylococcus aureus* merupakan flora normal yang terdapat pada kulit dan saluran pernafasan bagian atas (Entjang 2003).

Cara untuk mengidentifikasi *Staphylococcus aureus* adalah dengan mengisolasi sampel pada medium diferensial dan diidentifikasi berdasarkan sifat biakan, pewarnaan Gram, dan uji biokimiawi. Koloni yang tumbuh pada medium diamati dan dilanjutkan dengan berbagai uji, yaitu pewarnaan gram, uji katalase, dan uji koagulase. Uji tersebut dapat membedakan *Staphylococcus aureus* dengan bakteri coccus lainnya (Iskamto 2009). Koloni mikroskopik *Staphylococcus* berbentuk menyerupai buah anggur. Uji enzim katalase dapat membedakan

*Staphylococcus sp.* dan *Streptococcus sp.* *Staphylococcus sp.* bersifat katalase positif (Brooks dkk. 2012).

### **3. Toksin bakteri *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan penyakit infeksi ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah. Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomeilitis, dan endokarditis. *Staphylococcus aureus* juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik (Ryan *et al.* 1994). Pembenuhan bakteri biasanya dilakukan pada lempeng agar darah dan pembenuhan lainnya untuk identifikasi bakteri (Entjang 2003).

## **E. Antibakteri**

### **1. Pengertian Antibakteri**

Antibakteri didefinisikan sebagai obat-obatan yang aktif terhadap pertumbuhan bakteri yang terdiri dari dua jenis, yang diproduksi oleh mikroorganisme digolongkan sebagai antibiotik dan obat-obatan sintesis. Bentuk antibiotik kelompok terbesar dan ini dapat didefinisikan sebagai zat yang diproduksi oleh mikroorganisme, menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme lain (FKUI 2009).

### **2. Mekanisme Antibakteri**

Mekanisme antibakteri merupakan peristiwa penghambatan bakteri oleh antibakteri. Aktivitas antibakteri diukur *in vitro* untuk menentukan potensi agen antibakteri dalam larutan, konsentrasinya dalam cairan tubuh atau jaringan dan kepekaan mikroorganisme penyebab terhadap obat yang diketahui (Brooks dkk. 2012). Mekanisme aktivitas secara *in vivo* yaitu pertama perlakuan mengalami peradangan, dimana respon tubuh dengan penyempitan pembuluh darah (konstriksi), protein membentuk jaringan fibrosa untuk menutup luka. Ketika trombosit bersama protein menutup luka, luka menjadi lengket dan lembab membentuk fibrin. Pembuluh darah melebar dan karena serotonin yang dihasilkan

trombosit. Plasma darah mengalir luka dan melawan toksin yang dihasilkan bakteri, kemudian membawa oksigen dan nutrisi yang dibutuhkan untuk menyembuhkan luka dan membawa agen fagosit untuk melawan bakteri maupun jaringan yang rusak (Black & Hawks 2005). Peristiwa penghambatan pertumbuhan bakteri adalah melalui mekanisme tertentu sesuai sifat bahan obat dan mikroba yang digunakan. Mekanisme antibakteri dibagi menjadi lima kelompok yaitu mengganggu metabolisme sel bakteri, merusak membran sel bakteri, menghambat sintesis protein sel bakteri, menghambat sintesis dinding bakteri, dan menyebabkan kerusakan dinding sel sehingga permeabilitas terhadap beberapa zat intersel meningkat (Ganiswarna 1995).

### **3. Amoksisilin**

Amoksisilin merupakan penisilin semisintetik yang rentan terhadap penisilinase dan secara kimia serta farmakologis berhubungan dekat dengan ampisilin. Antibiotik golongan penisilin bekerja dengan cara menghambat pembentukan mukopeptida yang diperlukan untuk sintesis dinding sel mikroorganisme.

Amoksisilin merupakan antibiotik golongan penisilin berspektrum luas. Antibiotik ini stabil dalam suasana asam dan dirancang untuk penggunaan oral. Absorpsi amoksisilin dari gastrointestinal lebih cepat dan lebih sempurna daripada ampisilin karena absorpsi amoksisilin tidak terganggu dengan adanya makanan dalam lambung. Spektrum antimikroba amoksisilin pada dasarnya sama dengan ampisilin, tetapi amoksisilin tampaknya tidak begitu efektif untuk shigelosis dibandingkan ampisilin (Goodman & Gilman 2008).

## **F. Uji Aktivitas Antibakteri**

### **1. Metode**

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode difusi dan metode dilusi.

**1.1. Metode difusi.** Metode difusi dapat dilakukan menggunakan cakram (*disk*) kertas saring, sumuran atau silinder tidak beralas. Metode dengan sumuran atau silinder dilakukan dengan memasukkan larutan uji dengan konsentrasi

tertentu dalam sumuran. Diameter zona hambat sekitar sumuran yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambatan obat (Brooks dkk. 2012).

**1.2. Metode dilusi.** Metode dilusi dilakukan dengan mencampurkan secara homogen suatu obat dalam media dengan jumlah yang berbeda-beda atau membuat larutan obat dengan kadar yang berbeda-beda, masing-masing media ditambahkan suspensi kuman kemudian diinkubasi dan diamati daerah media yang jernih (Bonang & Koeswardono 1982). Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap pada media cair maupun padat. Media diinokulasi terhadap bakteri uji, selanjutnya diinkubasi dan diamati konsentrasi antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji.

## **2. Media bakteri**

Media adalah suatu bahan yang digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangkan mikroba. Media yang digunakan harus dalam keadaan steril artinya tidak ditumbuhi oleh mikroba lain yang tidak diharapkan. Agar mikroba dapat tumbuh dan berkembang dengan baik di dalam media maka diperlukan untuk persyaratan, antara lain dalam media harus terkandung unsur yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri, harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan, dan pH sesuai dengan kebutuhan mikroba, dan harus steril (Suriawiria<sup>2</sup> 1986).

Bentuk media ditentukan oleh ada tidaknya penambahan zat pematik seperti agar-agar, gelatin, dan sebagainya, maka bentuk media dikenal ada tiga jenis.

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

**2.2. Media cair.** Media tidak ditambahkan zat pematik, biasanya media cair dipergunakan untuk perbaikan mikro alga tetapi juga mikro lain, terutama bakteri dan ragi.

**2.3. Media semi cair atau padat.** Penambahan zat pematat hanya 50% atau kurang dari yang seharusnya. Umumnya diperlukan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup aerobik atau fakultatif (Suriawiria<sup>1</sup> 1986).

### **3. Sterilisasi**

Sterilisasi adalah suatu tindakan yang dilakukan dimana bahan atau peralatan yang dipergunakan di dalam bidang mikrobiologi, harus dalam keadaan steril. Artinya pada bahan atau peralatan tersebut tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang akan mengganggu atau merusak media ataupun mengganggu kehidupan dan proses yang sedang dikerjakan. Sterilisasi keadaan bebas dari mikroorganisme termasuk bentuk sporanya (Suriawiria 2005).

## **G. Landasan Teori**

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif yang bersifat patogen. Sebagian bakteri *Staphylococcus* merupakan flora normal pada kulit, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan pada manusia. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar (Warsa 1994). *Staphylococcus aureus* adalah salah satu bakteri yang menyebabkan infeksi pada manusia dan merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik. Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomeilitis, dan endokarditis (Ryan *et al.* 1994).

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* telah banyak diteliti mampu dihambat oleh berbagai tanaman, salah satunya tanaman *Syzygium sp.* Spesies dari *Syzygium sp.* yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri seperti *Syzygium aromaticum* (cengkeh), *Syzygium cumini* L. (jamblang), *Syzygium guineense* dan *Syzygium alternifolium* (Azim dkk. 2014; Ratman dkk. 2008).

*Syzygium myrtifolium* Walp. merupakan salah satu spesies genus *Syzygium sp.* yang bisa dikembangkan untuk mengetahui aktivitasnya sebagai antibakteri. Daun merah dan daun hijau pada tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium*



Walp.) mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu golongan alkaloid, triterpenoid, steroid, saponin, fenolik, dan flavonoid (Haryati dkk. 2015; Juwita dkk 2017), dan minyak atsiri (Gea 2017; Sembiring 2015). Senyawa-senyawa tersebut terkait dengan aktivitas antibakteri.

Senyawa alkaloid bersifat antibakteri, diduga dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Permatasari 2013). Terpenoid dapat bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat dan merusak porin, mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi, pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Rachmawati 2011). Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Permatasari 2013). Minyak atsiri dapat berfungsi sebagai antimikroba tetapi tidak semua minyak atsiri dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Minyak atsiri digunakan sebagai bahan antiseptik internal atau eksternal, bahan analgesik, sedatif, dan stimulan untuk obat sakit perut (Guenther 1987). Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri (Zahro 2013). Senyawa fenolik pada konsentrasi rendah dapat merusak membran sitoplasma dan dapat menyebabkan kebocoran inti sel, sedangkan pada konsentrasi tinggi senyawa fenol berkoagulasi dengan protein seluler. Eugenol yang banyak ditemukan pada minyak cengkeh (*Syzygium aromaticum*) adalah contoh senyawa fenolik yang bersifat bakteriostatik (Rachmawati 2011).

Maserasi adalah suatu proses penyarian dengan cara merendam serbuk simplisia di dalam pelarut tertentu disertai pengocokan berulang yang dapat menjamin suatu keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat dalam penyarian. Metode ini sederhana dan mudah dilakukan, tetapi membutuhkan waktu yang cukup lama dan penyariannya kurang sempurna (Ansel 1989; Voigt 1994). Pelarut yang digunakan dalam penelitian adalah etanol 96%. Etanol tidak menyebabkan pembengkakan membran sel dan memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut. Keuntungan lainnya adalah sifatnya yang mampu

menghambat kerja enzim. Etanol 96% juga memiliki kemampuan menyari dengan polaritas yang lebar mulai dari senyawa nonpolar sampai dengan polar (Saifudin *et al.* 2011). Hasil dari ekstraksi dengan metode maserasi kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi.

Fraksinasi adalah suatu cara untuk memisahkan golongan utama, kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawa setelah dipisahkan akan terjadi fraksi yang berbeda. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat nonpolar akan masuk ke pelarut nonpolar (Harborne 1987). Pelarut yang bersifat nonpolar adalah *n*-heksana, semipolar adalah etil asetat, dan polar adalah air. Senyawa yang bersifat nonpolar seperti minyak atsiri, triterpen, steroid, karotenoid, akan masuk ke pelarut nonpolar. Senyawa yang bersifat semipolar adalah komponen-komponen minyak atsiri tertentu, alkaloid, senyawa fenolik, asam fenolat, flavonoid, antrakinon, fenilpropanoid. Senyawa-senyawa yang bersifat polar seperti glikosida, tanin, garam alkaloid akan larut ke pelarut polar (Depkes 1987).

Daun merah pucuk merah pernah dilakukan fraksinasi dan menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana mengandung alkaloid, triterpenoid, steroid; fraksi etil asetat mengandung alkaloid, triterpenoid, fenolik, flavonoid; fraksi air mengandung triterpenoid, saponin, fenolik. Fraksi teraktif daun merah tanaman pucuk merah terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* adalah fraksi etil asetat (Haryati dkk. 2015).

Metode difusi merupakan metode yang sederhana, mudah dilakukan dan diamati aktivitas antibakteri. Metode difusi bertujuan untuk melihat ada atau tidaknya daya hambat dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.), aktivitas antibakteri terlihat dengan ada tidaknya daya hambat dengan adanya daerah jernih di sekitar cakram. Metode dilusi bertujuan untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap menggunakan metode cair. Bakteri uji diinokulasi pada media tersebut,

kemudian ditambahkan larutan uji dengan konsentrasi yang dapat menghambat atau mematikan bakteri *Staphylococcus aureus*.

### **H. Hipotesis**

Hipotesis penelitian ini yaitu :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Kedua, fraksi etil asetat dari daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang paling aktif menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Ketiga, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan kadar tertentu dari ekstrak atau fraksi teraktif daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) mempunyai daya hambatan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang tumbuh di daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel dalam penelitian ini adalah daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang segar, sehat, tidak terkena hama, dan merupakan urutan daun ke-10 sampai 20.

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

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

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun hijau dari tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang diekstraksi secara maserasi menggunakan larutan penyari etanol 96% dilanjutkan dengan fraksinasi yang menggunakan air, etil asetat, dan *n*-heksana.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari maserasi, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

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

Variabel bebas adalah variabel yang bila bersama dengan variabel lain, variabel lain berubah dalam variasinya. Variabel tergantung adalah variabel yang berubah karena variabel bebas. Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi 20%, 10%, 5%, 2,5%, dan 1,25% ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang diuji pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan metode difusi dan metode dilusi untuk fraksi teraktif.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang dipengaruhi oleh ekstrak daun hijau secara maserasi, fraksi air, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksana yang dilihat dari pertumbuhannya pada media selektif.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kondisi laboratorium (meliputi kondisi inkubasi, alat, dan bahan yang harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, dan metode penelitian, tempat tumbuh tanaman, waktu panen, metode ekstraksi maserasi.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) adalah daun hijau yang diambil dari tanaman pucuk merah pada bulan Februari 2018 di daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, yang segar, sehat, tidak terkena hama, dan merupakan urutan daun ke-10 sampai 20.

Kedua, serbuk daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) adalah daun hijau yang diambil kemudian dicuci pada air mengalir guna membersihkan kotoran yang masih menempel setelah itu dikeringkan dengan oven pada suhu oven 40<sup>0</sup>C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan no. 40.

Ketiga, ekstrak etanolik adalah hasil ekstraksi dari serbuk daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang diperoleh dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah fraksi dari ekstrak etanol 96% daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut nonpolar, kemudian dipekatkan dengan evaporator sehingga didapat fraksi *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksinasi dari residu *n*-heksana dengan menggunakan etil-asetat sebagai pelarut semipolar, kemudian dipekatkan dengan evaporator sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, fraksi air dari daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) adalah residu dari hasil fraksinasi fraksi etil asetat dengan menggunakan air sebagai pelarut polar, kemudian dipekatkan dengan waterbath.

Ketujuh, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri adalah uji yang dilakukan dengan uji difusi untuk ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air, dan uji dilusi untuk ekstrak atau fraksi teraktif.

Kesembilan, uji difusi adalah uji aktivitas antibakteri yang dilakukan dengan metode difusi cakram, yaitu kertas cakram (berdiameter  $\pm 6$  mm) yang mengandung senyawa uji ditempatkan pada permukaan agar yang sebelumnya diinokulasi dengan bakteri uji dan dilakukan pengukuran diameter zona hambat untuk mengukur kekuatan hambatan terhadap bakteri.

Kesepuluh, uji dilusi adalah uji aktivitas antibakteri yang dilakukan dengan metode dilusi untuk mengukur KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) pada satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, dan 20%.

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Bahan

**1.1. Bahan utama.** Bahan utama yang digunakan adalah daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang diambil dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

**1.2. Bahan kimia.** Bahan kimia untuk uji aktivitas dalam penelitian ini adalah etanol 96%, aquadest, DMSO 1%, etil asetat, *n*-heksana, kalium telurit 3,5%, Gram A (kristal violet), Gram B (garam iodin), Gram C, Gram D (safranin), dan amoksisilin.

**1.3. Bakteri uji.** Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

**1.4. Media.** Media yang digunakan adalah *Brain Heart Infusion (BHI)*, *Nutrien Agar (NA)*, *Muller Hinton Agar (MHA)*, dan *Vogel Johnson Agar (VJA)*.

#### 2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah meliputi oven, autoklaf, blender, cawan petri, corong kaca, deck glass, *vacuum rotary evaporator*, cakram disk (diameter  $\pm 6$ mm), gelas ukur (pyrex), inkas, jarum ose, kapas lidi steril, kaki tiga, labu erlenmeyer (pyrex), labu takar, mikroskop, *moisture balance*, objek glass, pembakar spirtus, pinset, pipet ukur 1 ml, rak tabung, penangas air, selang, tabung reaksi, dan timbangan analitik.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman pucuk merah dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman pucuk merah yang dibuktikan di Laboratorium Morfologi Sistemika Tumbuhan Universitas Setia Budi Surakarta dan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

### 2. Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) diambil urutan daun ke-10 sampai 20, yang segar, sehat, dan tidak terkena hama yang dikumpulkan pada wadah yang bersih.

Pembuatan serbuk daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) adalah dengan cara daun dikeringkan dengan oven pada suhu 40<sup>0</sup>C, setelah kering segera diserbuk dengan mesin penyerbuk kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 sehingga didapatkan serbuk daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) yang mempunyai derajat kehalusan yang relatif homogen. Hasil pembuatan serbuk yang berupa serbuk kering disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat yang selanjutnya akan digunakan untuk penelitian. Penyerbukan ini bertujuan agar luas permukaan partikel bahan yang kontak dengan larutan penyaring dapat diperluas sehingga penyaringan dapat langsung efektif.

### 3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.)

Penetapan kadar air daun hijau pucuk merah dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Sampel serbuk daun hijau pucuk merah 2 gram dimasukkan ke dalam *moisture balance*. Suhu diatur 105<sup>0</sup>C dan dihidupkan, ditunggu sampai alat berbunyi yang menandakan hasil analisis telah selesai. Kadar air akan memenuhi syarat apabila kadar air suatu serbuk simplisia tidak lebih dari 10%.

### 4. Pembuatan ekstrak etanolik

Pembuatan ekstrak daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) berdasarkan penelitian Haryati dkk. (2015) dan literatur Depkes RI (1986). Ditimbang serbuk daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam bejana lalu ditambahkan etanol 96% sebanyak 7,5 bagian. Campuran tersebut didiamkan selama 5 hari dengan sesekali digojog, setelah itu dipisahkan antara filtrat dengan ampas dengan menggunakan corong Buchner. Residu dibilas dengan 2,5 bagian pelarut, filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan

*rotary evaporator* pada suhu 40<sup>0</sup>C sehingga menjadi ekstrak etanol daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.).

Ekstrak yang telah pekat diuji sudah bebas etanol atau belum dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester yang khas (Praeparandi 1978).

## 5. Pengujian kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.). Identifikasi senyawa triterpenoid, minyak atsiri, saponin, flavonoid, fenolik, dan alkaloid dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

**5.1. Identifikasi triterpenoid.** Sebanyak 2 ml ekstrak daun hijau tanaman pucuk merah ditambahkan dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang terdiri dari 5 ml asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat 5 tetes. Terbentuknya warna merah berubah menjadi hijau tua menunjukkan hasil positif triterpenoid (Juwati 1998).

**5.2. Identifikasi minyak atsiri.** Sebanyak 2 ml ekstrak daun hijau pucuk merah ditambahkan dengan eter minyak tanah, lalu digojog berkali-kali, sisa dalam eter minyak tanah diuapkan, akan berbau harum (Depkes 1987).

**5.3. Identifikasi saponin.** Sebanyak 2 ml ekstrak daun hijau pucuk merah dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 10 ml air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap setinggi 1 sampai 10 cm. Penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Depkes 1995).

**5.4. Identifikasi flavonoid.** Sebanyak 2 ml ekstrak daun hijau pucuk merah dicampur 10 ml air panas, lalu ditambahkan 0,1 gram Mg dan 5 tetes HCl pekat. Reaksi positif adanya perubahan warna merah atau jingga.

**5.5. Identifikasi fenolik.** Sebanyak 2 ml ekstrak daun hijau tanaman pucuk merah dilarutkan dengan FeCl<sub>3</sub> 1% dalam air atau etanol. Reaksi positif adanya perubahan warna hijau, merah, biru, atau hitam yang pekat (Harborne 1987).

**5.6. Identifikasi alkaloid.** Sebanyak 2 ml ekstrak daun hijau di tambah dengan 4 ml larutan HCl 2N dan dikocok, kemudian ditambah 1 tetes larutan Mayer, terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning. Dengan Dragendrof terbentuk



endapan berwarna coklat sampai hitam, maka ada kemungkinan terdapat alkaloid (Depkes 1995).

## 6. Fraksinasi

Ekstrak kental daun hijau pucuk merah sebanyak 10 gram dilarutkan dengan 10 ml etanol dan 65 ml air, kemudian dimasukkan dalam corong pisah dan ditambahkan *n*-heksana 75 ml dengan diekstraksi cair-cair sampai fraksi *n*-heksana berwarna jernih. Fraksi *n*-heksana merupakan filtrat yang terletak di atas, sedangkan fraksi air merupakan filtrat yang terletak di bawah. Fraksi *n*-heksana dipisahkan dari fraksi air. Fraksi *n*-heksana yang dapat kemudian dipekatkan pada *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Fraksi air sisa dari fraksi *n*-heksana, kemudian difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat 75 ml dilakukan sampai hasil fraksi etil asetat berwarna jernih menggunakan corong pisah. Fraksi etil asetat merupakan filtrat yang terletak di atas, sedangkan fraksi air merupakan filtrat yang terletak di bawah. Fraksi etil asetat yang didapat kemudian dipekatkan di evaporator pada suhu 40°C.

Filtrat sisa fraksinasi dengan pelarut etil asetat adalah fraksi air. Filtrat dipekatkan dengan *waterbath* sampai kental.

## 7. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang digunakan dalam praktikum harus dalam keadaan steril. Cawan petri, pipet tabung reaksi, labu erlenmeyer, beaker glass, dan gelas ukur disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 150-170°C selama 30-60 menit. Alat penanam bakteri (ose/sengkelit) disterilkan dengan pemanasan api langsung, yaitu dengan melewati ose/sengkelit beberapa kali pada lampu spiritus. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-30 menit.

## 8. Pembuatan suspensi bakteri uji

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diambil dari suatu biakan murni pada media *Nutrien Agar* (NA) diambil kurang lebih 1 ose dan dibuat suspensi dalam tabung yang berisi media ***Brain Heart Infusion*** (BHI) yang kekeruhannya disesuaikan dengan standart MC Farland 0,5, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam (Bonang dan Koeswandoro 1982).

## 9. Identifikasi bakteri

**9.1. Identifikasi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara goresan.** Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang sudah siap, diinokulasi secara perataan dengan kapas lidi steril pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) dan penambahan kalium telurit 3,5% sebanyak 3 tetes dalam cawan petri, kemudian diinkubasi selama 24

jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Hasil identifikasi akan ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna hitam karena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat mereduksi telurit menjadi metalik dan *Staphylococcus aureus* dapat memfermentasi manitol menjadi suasana asam. Adanya *phenol red* maka medium di sekitar koloni berwarna kuning karena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mereduksi manitol (Hadieotomo 1985).

**9.2. Pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordan), Gram C (etanol:aseton = 1:1 sebagai peluntur), Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup). Bakteri *Staphylococcus aureus* dinyatakan positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati di bawah mikroskop.

**9.3. Identifikasi biokimia bakteri *S.aureus* ATCC 25923 secara katalase.** Uji katalase dapat dibuat dengan mencampurkan 0,5 ml hidrogen peroksida 3% dengan satu ose bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara (pelepasan oksigen) sebab *Staphylococcus aureus* mempunyai enzim katalase. Hal ini ditandai dengan terbentuk gelembung udara atau buih.

**9.4. Identifikasi biokimia bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara koagulase.** Uji koagulase dapat dilakukan dengan cara menyiapkan plasma darah diberi asam sitrat, diencerkan (1:5) ditambah satu ose biakan bakteri dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 1-4 jam. Hasil positif kuat jika tabung tes dibalik, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung (Brooks dkk. 2002).

## **10. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus***

Ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air yang diperoleh dari hasil ekstrak etanolik daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) masing-masing dibuat larutan stok dengan berbagai konsentrasi yaitu 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, dan 20%, dimana masing-masing bahan ditimbang dan ditambahkan DMSO 1% ± 10 ml. Perhitungan pembuatan larutan uji pada Lampiran 15. Setelah dibuat larutan stok selanjutnya diuji secara mikrobiologi dengan bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi dan dilusi.

**10.1. Uji difusi.** Dilakukan dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah dibuat kemudian diinokulasikan ke medium *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan metode perataan (*Spread Plate Method*) dengan

menggunakan kapas lidi steril dan didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Setiap cawan petri dibuat diagram 6 bagian dengan jarak yang sama lalu diberi label. Kertas cakram steril dijenuhkan dengan 10 µl larutan uji dan dikeringkan dalam cawan petri steril pada suhu ruangan, kemudian cakram yang telah dijenuhkan dengan larutan uji diletakkan pada masing-masing bagian dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam untuk pertumbuhan mikroba (Nufailah 2008). Cakram kertas amoksisilin 25 µg sebagai kontrol positif, pelarut DMSO 1% sebagai kontrol negatif, larutan uji ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dengan berbagai konsentrasi yaitu 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, dan 20%. Bakteri yang digunakan disesuaikan dengan Standart Mc Farland 0,5. Pengukuran diameter zona hambat pada area jernih yang ada di sekitar cakram dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri sekitar cakram menandakan bahwa kandungan kimia daun hijau tanaman pucuk merah memiliki daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus*. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali.

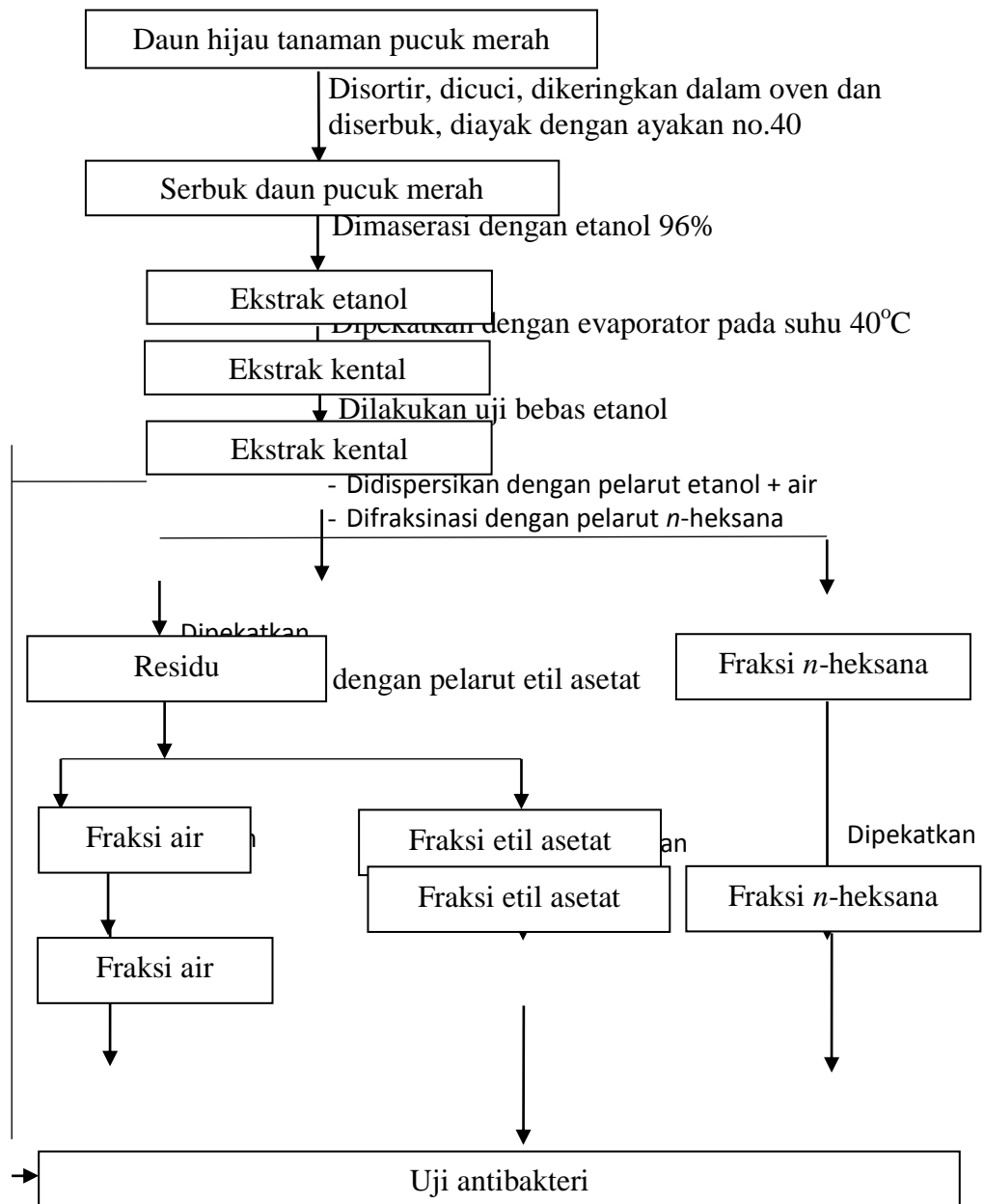
**10.2. Uji dilusi.** Ekstrak dan fraksi yang paling aktif dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 akan dilakukan uji dilusi. Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 7 tabung steril. Masing-masing tabung tersebut terdiri dari beberapa konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 20%, 10%, 5%, 2,5%, dan 1,25% kontrol positif, dan kontrol negatif. Suspensi bakteri dalam medium BHI dimasukkan ke dalam masing-masing tabung uji. Seluruh tabung uji diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24-48 jam, lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan cara mengamati tabung yang jernih atau tabung yang memberi hasil negatif, kemudian menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media *Vogel Johnson Agar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24-48 jam. Mengamati ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media *Vogel Johnson Agar* yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

### E. Analisis Hasil

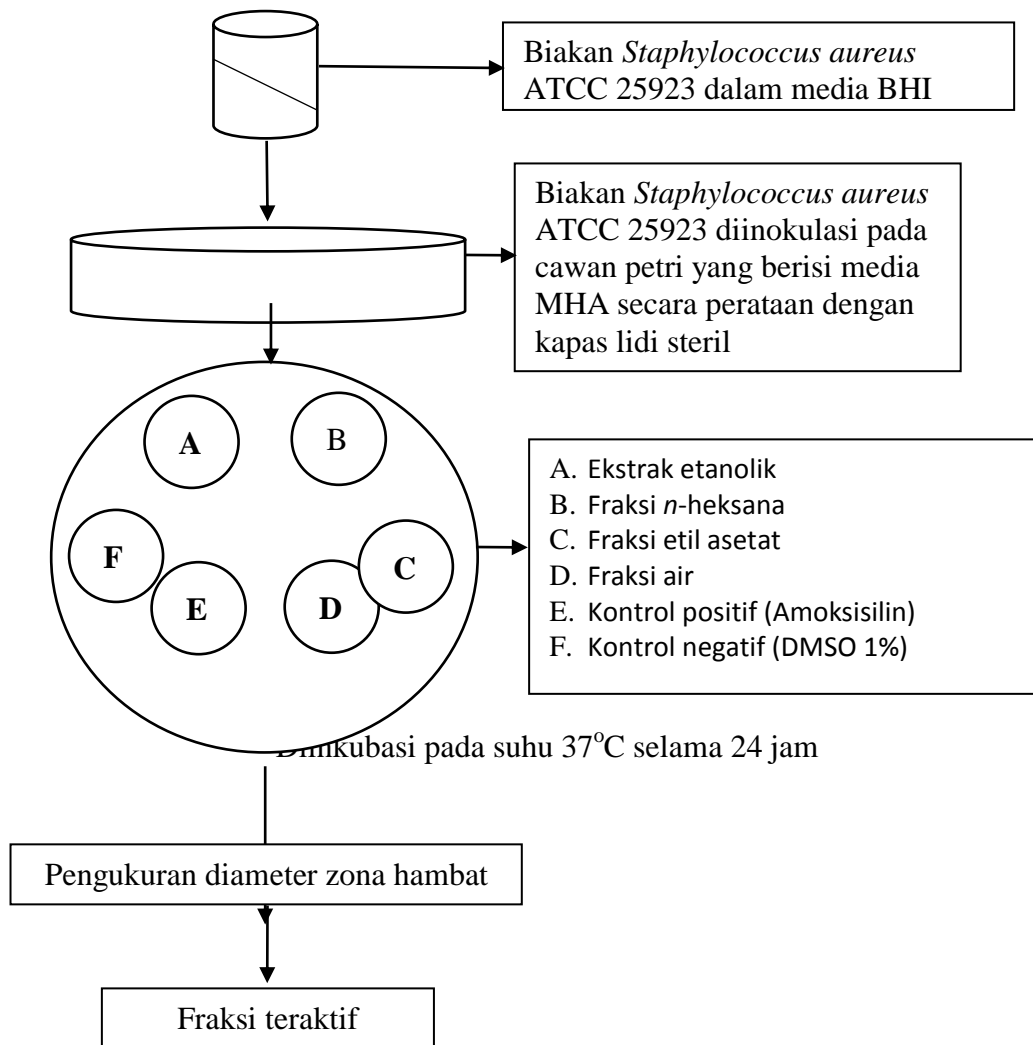
Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode difusi

cakram disk yang dinyatakan dengan diameter zona hambat (zona bening) yang terbentuk di sekeliling cakram. Diameter zona hambat dianalisis dengan uji Kolmogorov-Smirnov untuk menentukan data terdistribusi normal atau tidak. Jika data terdistribusi normal, dilanjutkan dengan statistik *Anova oneway*. Namun, jika tidak terdistribusi normal maka diuji dengan statistik non parametrik Kruskal-wallis.

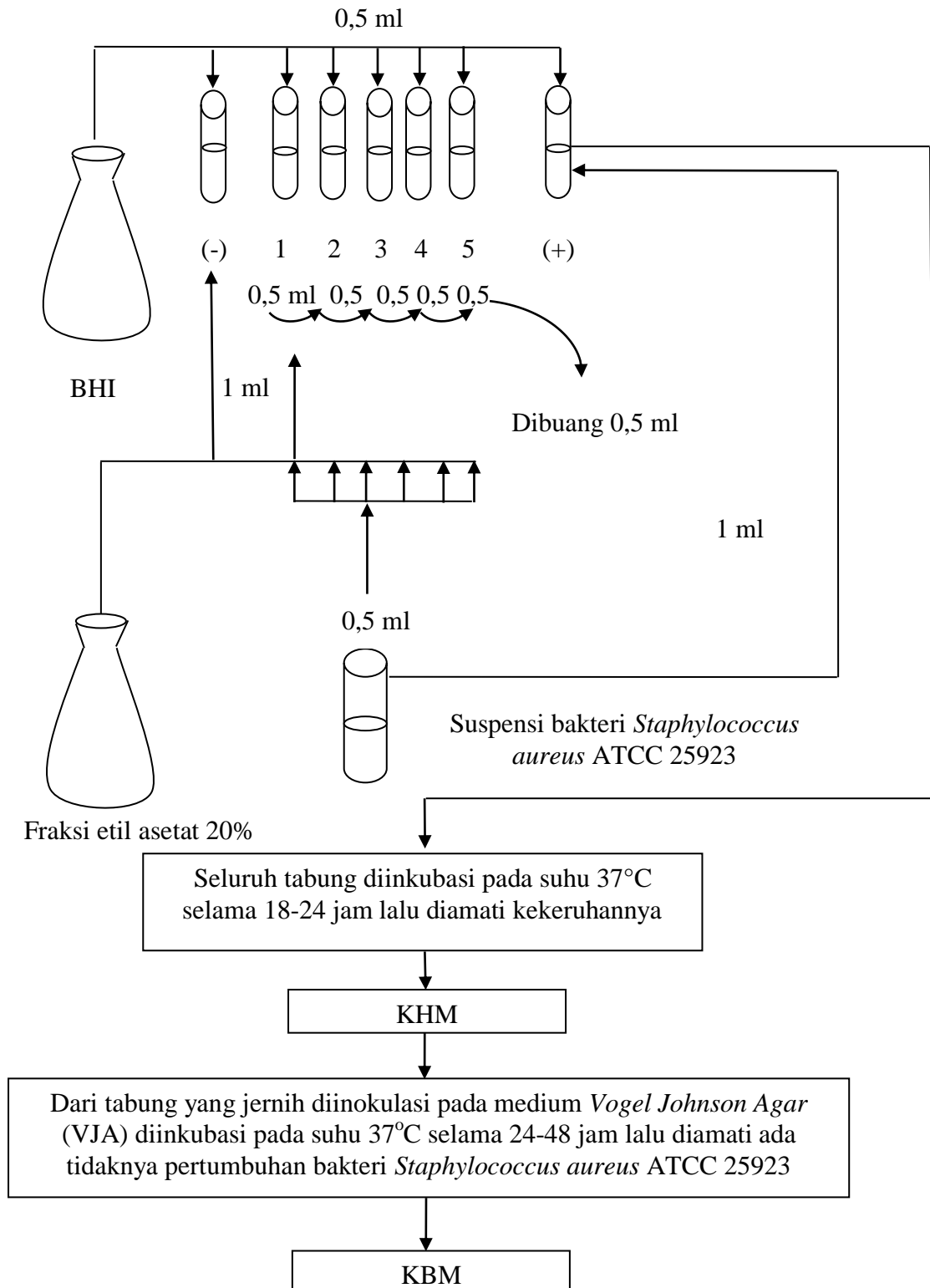
### F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanolik dan fraksinasi daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.).



**Gambar 3. Prosedur pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi.**



Gambar 4. Prosedur pengujian aktivitas antibakteri metode dilusi.

## BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

### A. Preparasi Daun Pucuk Merah

#### 1. Hasil determinasi tanaman daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.)

Tujuan dilakukan determinasi adalah untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan, mengetahui kebenaran tanaman serta mencocokkan ciri-ciri morfologi tanaman yang diteliti. Determinasi tanaman dilakukan berdasarkan kepustakaan yang dibuktikan di Laboratorium Morfologi Sistemika Tumbuhan, Universitas Setia Budi Surakarta dan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

**1.1. Determinasi tanaman.** Hasil determinasi pucuk merah berdasarkan Lampiran 1:

1b – 2b – 3b – 4b – 12b – 13b – 14b – 17b – 18b – 19b – 20b – 21b – 22b – 23b – 24b – 25b – 26b – 27b – 28b – 29b – 30b – 31b – 32b – 34a – 75b – 76a – 77b – 104b – 106b – 107b – 186b – 287b – 288b – 289a – 290b – 291a – 292b – 293b – 294a – 392b – 393b. Familia 84. *Myrtaceae*. 1a – 2b – 3b – 7b – 8b – 9b – 10b. 9. *Syzygium*. 1a – 7b – 8b – 11b – 13b – 14b – 15a – 16 b – 18b – 20a. ***Syzygium myrtifolium* (Roxb.) Walp.** Sinonim *Eugenia myrtifolia* Roxb., *Syzygium campallenum* Miq.

**1.2. Deskripsi tanaman.** Habitus tanaman pucuk merah: semak. Akar tunggang. Batang percabangan monopodial, berkayu. Daun tunggal, berhadapan, lanset sampai jorong, panjang 4,8 – 5,2 cm, lebar 1,5 – 2,1 cm, ujung meruncing, pangkal meruncing, tulang daun menyirip, tepi rata, berkulit, tangkai daun 1k 3mm. Bunga majemuk, malai, diujung dan ketiak daun, kelopak berbentuk tabung, dan kelopak 4 – 5, daun mahkota 4 – 5, stamen banyak, bakal buah tenggelam.

Berdasarkan hasil determinasi dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.).



## 2. Hasil pengumpulan bahan, pengeringan, dan pembuatan serbuk daun hijau pucuk merah

Penyiapan bahan untuk membuat serbuk daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) dilakukan dengan cara pengumpulan bahan dan pengeringan. Pengumpulan bahan daun hijau pucuk merah yang digunakan dalam penelitian ini diambil pada Bulan Januari 2018 dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Daun hijau pucuk merah yang telah dikumpulkan dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir sampai bersih dari kotoran kemudian dikeringkan. Pengeringan bahan dilakukan bertujuan untuk mengurangi kadar air serta mencegah tumbuhnya jamur dan mikroorganisme lain yang dapat menyebabkan pembusukan dan mencegah perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu. Pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 40<sup>0</sup>C selama 5 hari. Rendemen daun hijau pucuk merah yang diperoleh sebesar 30%.

**Tabel 1. Rendemen daun hijau pucuk merah kering**

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
8.000	2.400	30

Hasil pembuatan serbuk daun hijau pucuk merah yang telah dikeringkan, diserbuk, kemudian diayak dengan ayakan no.40. Penyerbukan ini bertujuan untuk memperluas permukaan partikel yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung dengan efektif. Perhitungan pada Lampiran 12.

## 3. Hasil penetapan susut pengeringan

**Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan**

Replikasi	Susut pengeringan (%)
1	6,0
2	6,0
3	6,5
Rata-rata	6,16 ± 0,354

Penetapan susut pengeringan dilakukan untuk memperoleh prosentase bahan yang menguap yang terdapat dalam serbuk pada pemanasan suhu 105<sup>0</sup>C dengan *moisture balance*. Bahan yang menguap pada suhu tersebut diantaranya adalah air dan minyak atsiri. Kadar air yang terlalu tinggi dapat mengaktifkan enzim-enzim dalam simplisia yang dapat mengakibatkan komposisi kimia pada

simplisia berubah atau rusak sehingga menurunkan kualitas. Berdasarkan Tabel 2 dan perhitungan pada Lampiran 13 hasil susut pengeringan serbuk daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) sebesar 6,16%. Karena serbuk daun hijau pucuk merah mengandung minyak atsiri (Gea 2017), maka kadar air serbuk 6,16% sehingga serbuk tersebut disimpulkan memenuhi persyaratan BPOM RI (2014), yaitu kadar air tidak lebih dari 10%.

#### 4. Hasil pembuatan ekstrak daun hijau daun pucuk merah

**Tabel 3. Rendemen ekstrak etanolik daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) dengan pelarut etanol 96%**

Bobot serbuk (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
500	115,87	23,17

Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi dengan menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Rendemen ekstrak maserasi daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) adalah 23,17%. Perhitungan rendemen ekstrak maserasi dapat dilihat pada Lampiran 14. Ekstrak etanolik kemudian dilakukan fraksinasi dengan *n*-heksana, etil asetat, dan air.

Ekstrak dari daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) dilakukan uji bebas etanol dengan melakukan esterifikasi alkohol. Hasil yang diperoleh bahwa ekstrak daun hijau pucuk merah sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 96% dengan ditandai tidak adanya lagi bau ester yang khas.

#### 5. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun hijau pucuk merah

Berdasarkan Tabel 4 dan Lampiran 11, hasil identifikasi menunjukkan bahwa daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) mengandung senyawa kimia triterpenoid, minyak atsiri, saponin, flavonoid, fenolik, dan alkaloid.

**Tabel 4. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi daun hijau pucuk merah.**

Jenis senyawa	Ekstrak etanolik	Fraksi etil asetat	Fraksi air
Alkaloid	+	+	-
Triterpenoid	+	+	-
Fenolik	+	+	+
Saponin	+	-	+
Flavonoid	+	+	-
Minyak atsiri	+	-	-

Keterangan: (+) = mengandung metabolit sekunder

(-) = tidak mengandung metabolit sekunder

## 6. Hasil fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan kandungan golongan utama yang satu dari kandungan golongan utama yang lain, berdasarkan sifat kepolaran dalam suatu tumbuhan. Penyarian awal yang dilakukan adalah maserasi dengan pelarut etanol 96%, dimana pelarut etanol 96% dapat menyari hampir keseluruhan senyawa yang terkandung pada simplisia, baik yang bersifat nonpolar, semipolar, dan polar. Selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan menggunakan *n*-heksana, sebagai pelarut nonpolar, etil asetat sebagai pelarut semipolar, dan air sebagai pelarut polar.

Fraksinasi ekstrak etanolik daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) sebanyak 10 gram dalam tiga kali *batch* fraksinasi yang difraksinasi dengan menggunakan *n*-heksana, etil asetat, dan air dengan volume tiap pelarut sebanyak 75 ml yang kemudian hasil fraksinasi dipekatkan dengan oven pada suhu 40<sup>0</sup>C, sehingga total ekstrak yang difraksinasi sebanyak 30 gram.

**Tabel 5. Rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.)**

Bobot ekstrak (g)	Fraksi	Bobot fraksi (g)	Rendemen %
30	<i>n</i> -heksana	1,72	5,73
	Etil asetat	6,96	23,20
	Air	3,54	11,80

Tabel 5 dan Lampiran 14 menyatakan bahwa hasil rendemen *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanolik daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) berturut-turut 5,73%, 23,20%, 11,80%. Rendemen total fraksi sebesar 40,73%, hal ini disebabkan bagian ekstrak yang tidak larut dalam air beretanol tidak diikutkan dalam fraksinasi dan dalam penelitian ini bagian yang tidak larut tersebut tidak ditimbang.

### B. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diambil dari biakan murni pada media *Nutrien Agar* (NA) 1 ose, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam dan kekeruhannya disesuaikan dengan standart MC Farland 0,5 yang konsentrasi kekeruhan bakteri sama dengan 10<sup>8</sup>

CFU/ml seperti gambar pada Lampiran 8. Selanjutnya digunakan untuk identifikasi menurut Bonang & Koeswardono (1982).

### C. Identifikasi Bakteri Uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

#### 1. Hasil identifikasi bakteri secara goresan

Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diinokulasi pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang ditambahkan 3 tetes kalium telurit 3,5% dalam cawan petri kemudian diinkubasi selama kurang lebih 24 jam pada suhu 37°C. Hasil goresan yang positif ditunjukkan dengan adanya koloni yang berwarna hitam akibat dari kemampuan *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 mereduksi kalium telurit. Warna sekitar koloni berwarna kuning akibat dari kemampuan *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 dapat memfermentasi manitol menjadi asam.

Terbentuknya koloni berwarna hitam



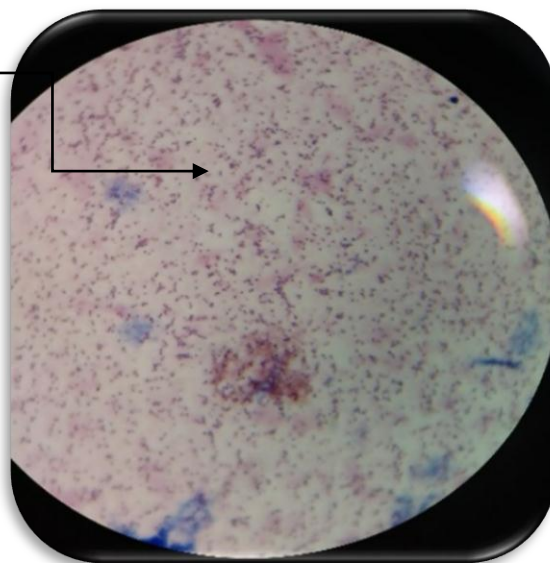
Gambar 5. Hasil identifikasi bakteri *S.aureus* ATCC 25923 secara goresan.

#### 2. Hasil identifikasi bakteri secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengelompokkan bakteri menjadi 2 yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pada pewarnaan Gram ini menggunakan 4 jenis reagen, yaitu kristal violet, iodine, alkohol, dan safranin. Bakteri Gram positif akan mempertahankan warna ungu dari kristal violet sehingga ketika diamati menggunakan mikroskop akan menunjukkan warna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif tidak dapat mempertahankan warna ungu dari kristal violet tetapi zat warna safranin dapat terserap pada dinding sel sehingga

saat dilihat dengan mikroskop akan memperlihatkan warna merah (Pratita & Putra 2012). Bakteri *Staphylococcus aureus* dinyatakan positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati di bawah mikroskop.

Hasil positif *S.aureus*  
berwarna ungu,  
berbentuk bulat  
bergerombol seperti  
buah anggur

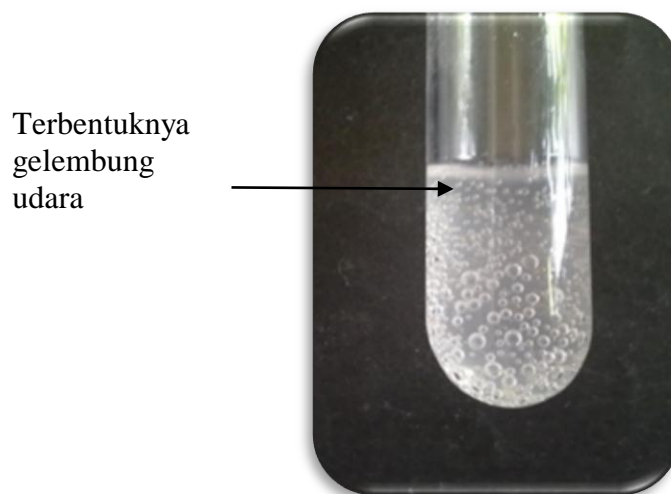


**Gambar 6.** Hasil identifikasi pewarnaan Gram bakteri *S.aureus* ATCC 25923.

### **3. Hasil uji katalase**

Uji katalase berguna dalam mengidentifikasi bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase yang hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara ( $O_2$ ). Bakteri katalase positif memiliki enzim katalase sehingga hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang diberikan diuraikan oleh bakteri, sehingga akan menghasilkan oksigen dan air.

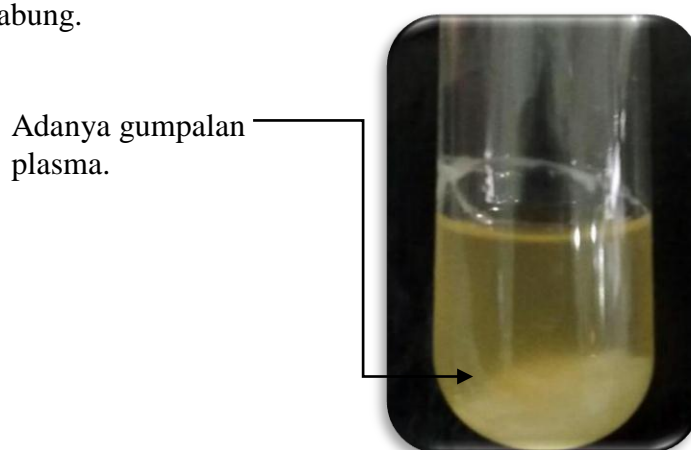
Hasil positif uji katalase bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 setelah ditambah 2 tetes  $H_2O_2$  3% terbentuk gelembung udara. Hal ini disebabkan karena *Staphylococcus aureus* mempunyai enzim katalase yang jika ditambah dengan air akan terurai menjadi  $H_2$  dan  $O_2$ . Uji katalase dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan Streptococcus karena Streptococcus tidak dapat menghasilkan enzim katalase (Hadioetomo 1985).



Gambar 7. Hasil identifikasi bakteri *S.aureus* ATCC 25923 dengan uji katalase.

#### 4. Hasil uji koagulase

Hasil dari uji koagulase bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan menggunakan plasma atau darah kelinci yang diberi sitrat, diencerkan (1:5) kemudian dicampur dengan biakan kaldu yang sama banyaknya ditambah 1 ose bakteri, lalu diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 1-4 jam. Hasil positif kuat jika tabung tes dibalik, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung.



Gambar 8. Hasil identifikasi bakteri *S.aureus* ATCC 25923 dengan uji koagulase.

### D. Pengujian Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi menggunakan metode difusi yaitu dengan mengetahui hambatan pertumbuhan dari biakan bakteri uji. Hasil dari ekstrak etanolik, fraksi

*n*-heksana, etil asetat dan air dari daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 untuk mengetahui ekstrak atau fraksi yang paling aktif.

### 1. Uji difusi

Pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) secara difusi dilakukan terhadap bakteri uji dengan konsentrasi larutan 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25% dan pembanding kontrol positif amoksisilin, kontrol negatif DMSO 1%. Perhitungan konsentrasi larutan terdapat pada Lampiran 15. Pembuatan suspensi bakteri uji disesuaikan dengan kekeruhan modifikasi standart Mc Farland 0,5. Masa inkubasi 24 jam pada suhu 37°C, ada tidaknya daya hambat yang teramati dalam ukuran mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar kertas cakram yang menandakan bahwa kandungan ekstrak atau fraksi dari daun hijau pucuk merah memiliki daya hambat terhadap bakteri uji.

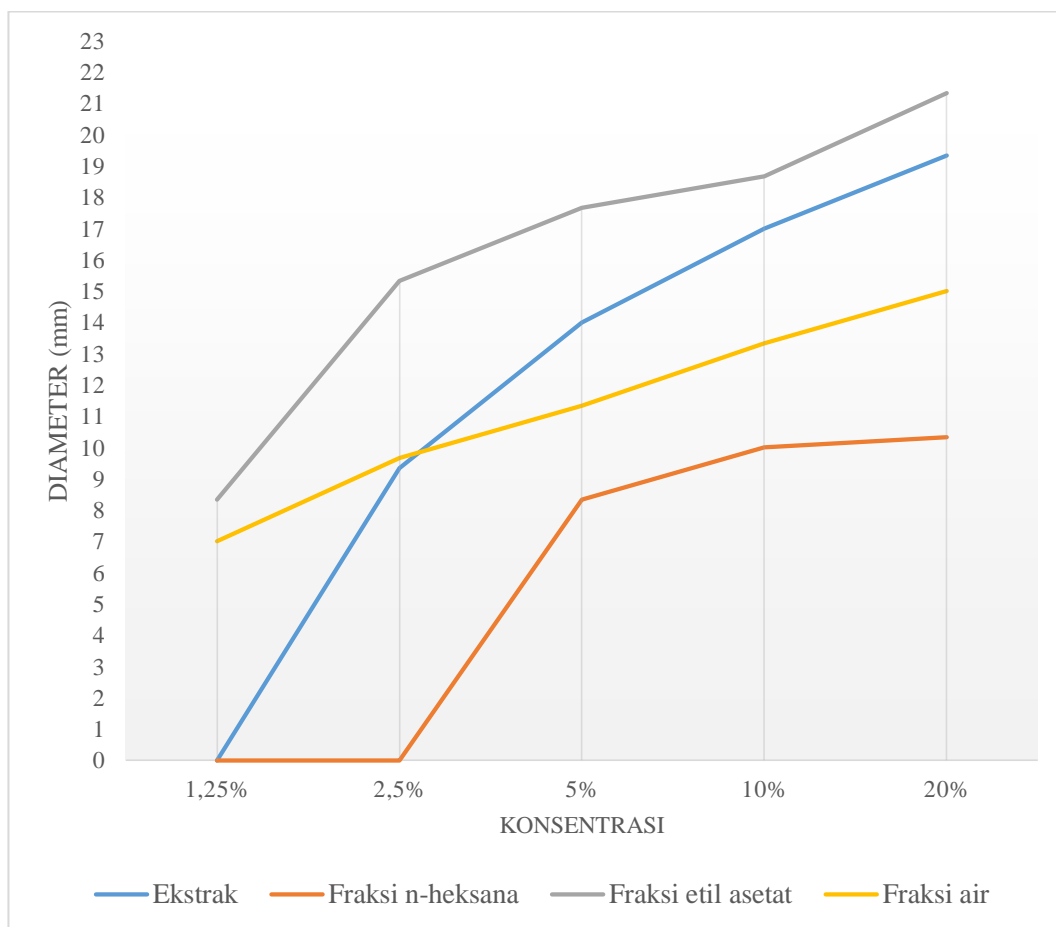
Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air terhadap bakteri uji menunjukkan daya hambat, ini dibuktikan dengan adanya daerah jernih di sekitar kertas cakram yang tidak ditumbuhi bakteri. Gambar hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi terdapat pada Lampiran 9.

Tabel 6 dan Gambar 9 menunjukkan hasil penelitian bahwa ekstrak etanolik dan fraksi daun hijau mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Semakin tinggi konsentrasi, semakin besar zona hambat yang terbentuk terhadap *Staphylococcus aureus*. Namun pada ekstrak etanolik dengan konsentrasi 1,25% serta fraksi *n*-heksana konsentrasi 1,25% dan 2,5% tidak memiliki zona hambat. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi ini menggunakan kontrol positif antibiotik cakram amoksisilin 25 µg yang dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*, dan kontrol negatif DMSO 1% yang dalam pengujian ini tidak mampu menghambat bakteri uji.

**Tabel 6. Diameter hambat uji aktivitas secara difusi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Sediaan uji	Konsentrasi (%)	Diameter daya hambat (mm)			Rata-rata ± Standar deviasi
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak etanolik	1,25	0	0	0	0 ± 0,00
	2,5	9	10	9	9,33 ± 0,577
	5	14	14	14	14,00 ± 0,000
	10	17	18	16	17,00 ± 1,000
	20	20	20	18	19,33 ± 1,155
Fraksi <i>n</i> -heksana	1,25	0	0	0	0 ± 0,000
	2,5	0	0	0	0 ± 0,000
	5	9	9	7	8,33 ± 1,155
	10	10	11	9	10,00 ± 1,000
	20	10	11	10	10,33 ± 0,577
Fraksi etil asetat	1,25	8	8	9	8,33 ± 0,577
	2,5	14	16	16	15,33 ± 1,155
	5	17	18	18	17,67 ± 0,577
	10	18	19	19	18,67 ± 0,577
	20	21	21	22	21,33 ± 0,577
Fraksi air	1,25	7	7	7	7,00 ± 0,000
	2,5	9	10	10	9,67 ± 0,577
	5	10	12	12	11,33 ± 1,155
	10	13	14	13	13,33 ± 0,577
	20	14	16	15	15,00 ± 1,000
Kontrol (+) amoksisilin	25 µg	17	19	19	18,33 ± 1,155
Kontrol (-) negatif		0	0	0	0 ± 0,000





**Gambar 9. Grafik rata-rata diameter zona hambat.**

Untuk membandingkan ada tidaknya perbedaan aktivitas antibakteri antara ekstrak etanolik, fraksi, dan kontrol positif, maka dilakukan uji statistik. Berdasarkan Lampiran 17, hasil analisis uji Shapiro-Wilk menunjukkan nilai sig.  $< 0,05$ , yang berarti data tidak terdistribusi normal. Oleh sebab itu, analisis selanjutnya menggunakan uji Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney. Hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan nilai sig.  $0,000 < 0,05$ , artinya terdapat perbedaan signifikan antara diameter zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* pada kelompok ekstrak etanolik dan fraksi daun hijau pucuk merah.

Fraksi *n*-heksana memiliki aktivitas antibakteri paling rendah dan berdasarkan uji Mann-Whitney berbeda signifikan dengan ekstrak etanolik dan kedua fraksi lainnya. Ekstrak etanolik daun hijau pucuk merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* lebih tinggi dari pada fraksi *n*-heksana, dan tidak berbeda signifikan dengan fraksi etil asetat dan fraksi air.

Ekstrak etanolik dan fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri paling besar yang tidak berbeda nyata. Namun hasil statistik ekstrak etanolik dan fraksi etil asetat, jika dibandingkan dengan fraksi air menunjukkan hasil yang berbeda yaitu fraksi etil asetat berbeda signifikan dengan fraksi air, sedangkan ekstrak etanolik tidak berbeda signifikan. Oleh sebab itu, fraksi yang paling aktif dalam menghambat *Staphylococcus aureus* adalah fraksi etil asetat yang tidak berbeda sig. dengan ekstrak etanolik.

Analisis statistik juga dilanjutkan untuk membandingkan konsentrasi terbesar ekstrak etanolik dan fraksi dengan kontrol positif amoksisilin 25 µg. Hasil uji Mann-Whitney menunjukkan bahwa, kontrol positif 25 µg amoksisilin memiliki aktivitas tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi 20% pada ekstrak etanolik, fraksi etil asetat, dan fraksi air, konsentrasi 10% pada ekstrak etanolik, fraksi etil asetat, dan fraksi air, konsentrasi 5% pada ekstrak etanolik dan fraksi etil asetat, dan konsentrasi 2,5% pada fraksi etil asetat. Hasil uji ini menunjukkan bahwa konsentrasi yang aktivitas antibakteri paling banyak kesamaan dengan kontrol positif adalah fraksi etil asetat.

Aktivitas antibakteri daun pucuk merah disebabkan oleh kandungan senyawa kimia yang terdapat didalamnya seperti, triterpenoid, minyak atsiri, flavonoid, saponin, fenolik, dan alkaloid.

Mekanisme kerja senyawa terpenoid sebagai zat antibakteri diduga melibatkan kerusakan membrane oleh senyawa lipofilik (Cowan 1999). Terpenoid dapat bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membrane luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat dan merusak porin, mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi, pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Rachmawati dkk. 2011). Salah satu senyawa terpenoid yang ada pada daun *Syzygium myrtifolium* Walp. adalah asam betulinat (*3β-3-Hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid*) yang bersifat antoksidan, antitumor, antiangiogenesis (Aisha dkk. 2013), dan dapat menghambat HIV (Cowan 1999).

Minyak atsiri dapat berfungsi sebagai antimikroba tetapi tidak semua minyak atsiri dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Minyak atsiri digunakan

sebagai bahan antiseptik internal atau eksternal, bahan analgesik, sedatif, dan stimulan untuk obat sakit perut (Guenther 1987).

Senyawa flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai respon terhadap infeksi mikroba sehingga efektif sebagai zat antibakteri yang ampuh melawan berbagai mikroorganisme. Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Permatasari dkk. 2013). Ekstrak total dan fraksi etil asetat yang mengandung flavonoid menghasilkan daya antibakteri yang lebih besar dibanding fraksi lain.

Senyawa alkaloid bersifat antibakteri, diduga dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Permatasari dkk. 2013).

Saponin termasuk dalam zat antibakteri yang menghambat fungsi membran sel mikroba. Saponin membentuk senyawa kompleks dengan membran sel melalui ikatan hidrogen sehingga menghancurkan sifat permeabilitas dinding sel, menyebabkan pelepasan isi sel dan menimbulkan kematian sel (Rachmawati dkk. 2011).

Senyawa fenolik pada konsentrasi rendah dapat merusak membran sitoplasma dan dapat menyebabkan kebocoran inti sel sedangkan pada konsentrasi tinggi senyawa fenol berkoagulasi dengan protein seluler. Eugenol yang banyak ditemukan pada minyak Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) adalah contoh senyawa fenolik yang bersifat bakteristatik (Rachmawati dkk. 2011).

Berdasarkan hasil penelitian ini dan penelitian Haryati (2015), disimpulkan bahwa daun pucuk merah, baik daun merah maupun daun hijau memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Kedua jenis daun memiliki aktivitas yang sama antara ekstrak etanolik dan fraksi etil asetatnya. Namun, pada daun hijau memiliki aktivitas antibakteri lebih besar daripada daun merah. Hal ini ditunjukkan pada konsentrasi 16% fraksi etil asetat diameter zona hambatnya 10,63 mm, sedangkan pada penelitian ini fraksi etil asetat dari daun

hijau pucuk merah dengan konsentrasi 20% memiliki diameter zona hambat 21,33 mm.

## 2. Uji dilusi

Uji dilusi dilakukan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari daun hijau pucuk merah. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari fraksi teraktif etil asetat daun hijau pucuk merah terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tidak dapat ditentukan karena kekeruhan pada tabung reaksi tidak bisa diamati. Hal ini disebabkan oleh bahan yang diuji sudah berwarna sehingga kekeruhan pada tabung tidak bisa ditentukan. Oleh karena itu semua pengenceran dilakukan pengujian inokulasi pada media VJA (*Vogel Johnson Agar*) untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Berdasarkan Tabel 7 dan Lampiran 10 dapat dilihat bahwa uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan sebanyak tiga kali replikasi dengan menggunakan konsentrasi 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, kontrol (+) (Suspensi bakteri), dan kontrol (-) (Fraksi etil asetat). Hasil pengujian menunjukkan bahwa Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat adalah konsentrasi 5%.

**Tabel 7. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara dilusi**

Konsentrasi (%)	Replikasi		
	1	2	3
20	-	-	-
10	-	-	-
5	-	-	-
2,5	+	+	+
1,25	+	+	+
K (+)	+	+	+
K (-)	-	-	-

Keterangan: (+) ada pertumbuhan koloni pada media selektif

(-) tidak ada pertumbuhan koloni bakteri pada media selektif

Kontrol (-) = Fraksi etil asetat

Kontrol (+) = Suspensi bakteri

Hasil uji fraksi etil asetat yang merupakan fraksi teraktif, menunjukkan bahwa golongan senyawa aktifnya adalah flavonoid, fenolik, terpenoid, dan alkaloid yang dapat menghasilkan daya antibakteri yang lebih besar dibandingkan fraksi lain.

Pucuk merah diketahui kaya akan kandungan flavonoid, salah satunya senyawa *dimethyl cardamonim* (*2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone*), suatu golongan kalkon yang memiliki sifat sitotoksik., dimana senyawa golongan kalkon diketahui memiliki aktivitas antikanker, anti-inflamasi, antioksidan, analgesik, antibakteri, antijamur, dan antiprotozoa (Memon dkk. 2014). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel, dan menghambat metabolisme energi (Hendra dkk. 2011). Mekanisme antibakteri flavonoid yang menghambat sintesis asam nukleat adalah cincin A dan B yang memegang peran penting dalam proses interkalisasi atau ikatan hidrogen dengan menumpuk basa asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA. Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri. Flavonoid dapat menghambat metabolisme energi dengan cara menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri (Cushnie 2005). Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membran sel adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria dkk. 2009).

Mekanisme senyawa fenol sebagai antibakteri pada konsentrasi rendah adalah dengan merusak membran sitoplasma dan dapat menyebabkan kebocoran inti sel, sedangkan pada konsentrasi tinggi senyawa fenol berkoagulasi dengan protein seluler. Aktivitas tersebut sangat efektif ketika bakteri dalam tahap pembelahan dimana lapisan fosfolipid di sekeliling sel sedang dalam kondisi yang sangat tipis sehingga fenol dapat dengan mudah merusak isi sel (Volk & Wheller 1984).

Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan

polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang akan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Cowan 1999).

Senyawa alkaloid bersifat antibakteri, diduga dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Permatasari dkk. 2013). Alkaloid kuartener planar seperti berberin dan harmone mampu berinteraksi dengan DNA (Cowan 1999).

Kontrol positif terbukti efektif dalam menghambat bakteri ditunjukkan dengan zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Hal ini di tunjukkan dengan diameter zona hambat yang terbentuk, zona hambat kontrol (+) lebih besar. DMSO 1% digunakan dalam pengenceran fraksi karena DMSO 1% tidak dapat membunuh bakteri. Fraksi yang memiliki aktivitas paling aktif adalah fraksi etil asetat.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat disimpulkan bahwa:

Pertama, ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Kedua, fraksi etil asetat daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) adalah yang paling aktif sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan dengan fraksi lain.

Ketiga, KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) fraksi etil asetat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* tidak dapat ditentukan, sedangkan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dari fraksi teraktif etil asetat adalah 5%.

#### **B. Saran**

Pertama, perlu dilakukannya uji aktivitas antibakteri dengan metode penyarian dan pelarut yang lain.

Kedua, perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut tentang antibakteri dengan cara isolasi menggunakan metode kromatografi lapis kolom.

Ketiga, dilakukan penelitian lebih lanjut aktivitas daun hijau tanaman pucuk merah terhadap bakteri patogen lain.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aisha AFA, Ismail Z, Salah K, Shidiqui JM, Gafar G dan McLaughlin JL. 2013. *Syzygium campanulatum* Korth. methanolic extract inhibits angiogenesis and tumor growth in nude mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13:168.
- Ansel HC. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi IV. Farida Ibrahim, Asmanitar, Lis Ais Aisyah, Penerjemah; Jakarta: Universitas Indonesia Press. Terjemahan dari *Introductory Froms of Pharmaceutical Preparations*.
- Azim MHMAE, El-Mesallamy AMD, El-Gerby M, Awad A. 2014. Anti-tumor, antioxidant and antimicrobial and the phenolic ponstituents of clove flower buds (*Syzygium aromaticum*). *Journal Microbial and Biochemical, Technology*. S8:007.
- Black and Hawks. 2005. *Medical Surgical Nurshing. Clinical Management for Positive Outcomes 7<sup>th</sup> Edition*. Missouri: Elsevier Saunders.
- Bonang G, Koeswardono ES. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik*. Bagian Mikrobiologi fakultas Kedokteran. Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya. Yogyakarta: Gramedia. Hal 65-68.
- [BPOM RI] Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2014. Peraturan Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomo12 Tahun 2014 Tentang Pesyaratan Mutu Obat Tradisional. Jakarta: Menteri Kesehatan.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. 2002. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. Twenty Second Edition. United States of America: The McGraw-Hill Companies.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 25. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, penerjemah. Jakarta: Penerbit Salemba Medika.
- Cushnie TP Tim Lamb, Andrew J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 343-356.
- Cowan MM. 1999. *Plant Product as Antimicrobial Agents*. Oxford. Miami University. Hal. 331.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 3-12, 21-34.



- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1987. *Analisis Obat Tradisional*. Jilid I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Materia Medika Indonesia*. Jilid VI. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2004. *Sistem Kesehatan Nasional*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Entjang I. 2003. *Mikrobiologi dan parasitologi untuk Akademi Keperawatan dan Sekolah Tenaga Kesehatan*. Bandung: Citra Aditya Putra.
- [FKUI] Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2009. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Ganiswarna SE. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi IV. Jakarta: Bagian Farmakologi, Universitas Indonesia.
- Gea TS. 2017. Analisis kadar dan profil kromatografi lapis tipis (KLT) minyak atsiri daun muda dan daun tua tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) [KTI]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Goodman & Gilman. 2008. *Dasar Farmakologi Terapi*. Volume 2. Hardman JC, Limbird LE, editor: Musadad A, Soemardji AA, Nawawi A, Retnoningrum DS, Sukandar EY, Andyana IK, Setia L, Iwo MI, Singgih M, Kusmardiyani M, Kusmardiyani S, Soebito S, Asyarie S, Suwendar, Syarif WR, tim ahli Bahasa, Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Guenther E. 1987. *Minyak Atsiri*. Jilid I. Kateran S, penerjemah. Cetakan 1, Penerbit Universitas Indonesia: Jakarta. Hlm 12, 13.
- Gunawan D dan Mulyani S. 2004. *Farmakognosi*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hadioetomo RS. 1985. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. Jakarta: Gramedia.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Ed II. Padmawinata K, Soediro I, Penerjemah; Bandung. ITB Bandung. Terjemahan dari *Phytochemical Methods*.
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metoda dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1:119,122.
- Haryati NA, Saleh C, Erwin. 2015. Uji toksisitas dan aktivitas antibakteri ekstrak daun merah tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap

- bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Mulawarman*. 13(1):35-40.
- Hasti S, Emrizal, Susilawati F. 2016. Uji aktivitas antidiabetes ekstrak *n*-heksan daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap mencit putih diabetes. *Journal Pharmacy*. 13:172-181.
- Hendra R, Ahmad S, Sukari A, Shukor MY, and Oskoueian E. 2011. Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. *Int. J. Mol. Sci*. 12:3422–3431.
- Herbarium Medanense. (2015). *Identifikasi Tumbuhan*. Medan: Herbarium Medanense Sumatera Utara.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT dan Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams and Wilkins. United States of America.
- Iskamto B. 2009. *Bakteriologi Kesehatan*. Surakarta: Sebelas Maret University Press. Hlm 105-107.
- Juwati K. 1998. *Penuntun Praktikum Biokimia untuk Keperawatan*. Depok: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Indonesia.
- Juwita R, Saleh C, Sitorus S. 2017. Uji aktivitas antihiperurisemia dari daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap mencit jantan (*Mus musculus*). *Jurnal Atomik*. 02:162-168.
- Kristijono A. 2004. *Obat Tradisional dan Fitofarmaka*. Kediri: Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri.
- Larasati ED, Nurlaelih EE, Sitawati. 2017. Tanggap pertumbuhan dan warna daun pucuk merah (*Syzygium oleana*) pada dosis pupuk MgSO<sub>4</sub> dan tingkat naungan. *Jurnal Produksi Tanaman*. 10:1-9.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida*. Karya Ilmiah. Universitas Sumatera Utara. Medan. Tidak Diterbitkan.
- List P. H and Schmidt P.C. 2000. *Phytopharmaceutical Technology*. Alih bahasa: David Ellaby. Florida: CRC Press. Hal.67, 71-73.
- Mahmoud I, Marzouk M, Moharram M, El-Gindi M, Hassan A. 2001. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry*. 58: 1239-1244.

- Marchaban, C.J. Soegihardjo, F.E. Kumarawati. 2001. Uji aktivitas sari daun randu (*Ceiba petandra* Gaertn) sebagai penumbuh rambut. *Jurnal Universitas Gadjah Mada*.
- Memon AH, Ismail Z, Aisha AFA, Al-Suede FSR, Hamil MSR, Hashim S, Saeed MAA, Laghari M, Majid AMSA. 2014. Isolation, characterization, crystal structure elucidation and anticancer study of dimethyl cardamonin, isolated from *Syzygium campanulatum* Korth. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014: 1-11.
- Ngoci NS, Evalyne M, Ng'ang'a E. 2013. Screening for anti-bacterian activity and phytochemicals of *Leonotis nepetifolia* leaves methanol extract. *Journal of Biotechnological Sciences*. 1(1):15-21.
- [NPB] National Parks Board. 2013. *Syzygium myrtifolium* (Roxb.) Walp. <http://florafaunaweb.nparks.gov.sg/special-pages/plantdetail.aspx?id=3156> [20 November 2017].
- Nufailah, dkk. 2008. Uji aktivitas antibakteri produk reduksi asam palmitat dalam sistem NaBH<sub>4</sub>/BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Universitas Diponegoro*.
- Nuria MC, Faizaitun A, Sumantri. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha Curcas* L) terhadap bakteri *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923, *Escherichia Coli* ATCC 25922, dan *Salmonella Typhi* ATCC 1408. *Jurnal Mediagro*. 5(2):26–37.
- Permatasari GAAA, Besung INK, Mahatmi H. 2013. Daya hambat perasan daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Indonesia Medicus Veterinus*. 2(2):162-169.
- Praeparandi. 1978. *Card System Analisa Kimia Farmasi Kualitatif*. Bandung: Seksi Diktat Stenhl.
- Pratita MYE, Putra SE. 2012. Isolasi dan identifikasi bakteri termofilik dari sumber mata air panas di Songgoriti setelah dua hari inkubasi. *Jurnal Teknik Pomits*. 1(1).
- Rachmawati F, Nuria MC, Sumantri. 2011. Uji aktivitas antibakteri fraksi kloroform ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica* (L) Urb) serta identifikasi senyawa aktifnya. *Jurnal Universitas Wahid Hasyim*.
- Ratman KV, Raju RRV. 2008. In vitro antimicrobial screening of the fruit extracts of two *Syzygium* Species (*Myrtaceae*). *Journal Advances in Biological Research*. 2:17-20.

- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Kosasih Padmawinata, Penerjemah; Bandung: ITB. Terjemahan dari: *The Organic Constituent of Higher Plant*.
- Ryan KJ, Champoux JJ, Fakow S, Plonde JJ, Drew WL, Neidhard FC, Roy CG. 1994. *Medical Microbiology an Introduction to Infectious Diseases*. 3<sup>rd</sup> ed. Connecticut: Appleton & Lange. 254.
- Saifuddin A, Rahayu V, Teruna HY. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Salisbury FB, Ross CW. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 3. Bandung: Institut Teknologi Bandung Press.
- Santoni A, Darwis D, Syahri S. 2013. Isolasi antosianin dari buah pucuk merah (*Syzygium campanulatum* Korth.) serta pengujian antioksidan dan aplikasi sebagai pewarna alami. *Jurnal Prosiding Semirata FMIPA*, Lampung: Universitas Lampung.
- Sembiring, F.R. 2015. Karakteristik minyak atsiri dari daun tanaman pucuk merah (*Syzygium campanulatum* Korth). *Jurnal Ilmu-Ilmu Kehutanan*. 1(1):1-8.
- Suriawiria U<sup>1</sup>. 1986. *Pengantar Untuk Mengenal dan Menanam Jamur*. Bandung: Angkasa.
- Suriawiria U<sup>2</sup>. 1986. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Bandung: Angkasa.
- Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Tapas Sinar Sinanti.
- Taiz L and Zeiger E. 2002. *Secondary Metabolism and Plant Physiology*. 3<sup>rd</sup> edition. Sinauer Associated, Sunderland. Hlm 286-299.
- Voigt R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi V. Soewandi SS, Widiyanto MB. Penerjemah; Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Hlm 566-567, 570-573, 569, 561.
- Volk, Wheller. 1984. *Mikrobiologi Dasar*, diterjemahkan oleh Soenartono Adisoemarto, hal. 137-138, Erlangga, Jakarta.
- Wahyono H. 2007. *Peran Mikrobiologi Klinik Pada Penanganan Penyakit Infeksi*. Makalah Pidato Pengukuhan Guru Besar Dalam Ilmu Mikrobiologi. Semarang: Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.
- Warsa UC. 1994. *Staphylococcus dalam buku ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Revisi. Jakarta: Penerbit Binarupa Aksara.
- Zahro L, Agustini R. 2013. Uji efektifitas antibakteri ekstrak kasar saponin jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Antibacterial effectivity test of saponins crude extract from white oyster

mushroom (*Pleurotus ostreatus*) against *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. [http://www.scribd.com/doc/189298120/Uji\\_Efektifitas\\_Aantibakteri\\_Ekstrak\\_Kasar\\_Saponin\\_Jamur\\_Tiram\\_Putih\\_Pleurotus\\_ostreatus\\_Terhadap\\_Staphylococcus\\_aureus\\_dan\\_Escherichia\\_coli\\_Antibakteri](http://www.scribd.com/doc/189298120/Uji_Efektifitas_Aantibakteri_Ekstrak_Kasar_Saponin_Jamur_Tiram_Putih_Pleurotus_ostreatus_Terhadap_Staphylococcus_aureus_dan_Escherichia_coli_Antibakteri). [21 November 2017].

Zulfikar E, Wiendarlina IY, Wardatun S. 2017. Penelusuran potensi antikanker daun pucuk merah (*Syzygium campanulatum* Korth) dengan metode *Brine Shrimps Lethality Test* (BSLT). *Jurnal Universitas Pakuan*.

# LAMPIRAN

## Lampiran 1. Surat keterangan determinasi tanaman pucuk merah



### UPT- LABORATORIUM

No : 265/DET/UPT-LAB/28/V/2018  
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Anggriani Lona  
NIM : 15113375 A  
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* (Roxb.) Walp.)**

Hasil determinasi berdasarkan : **Baker : Flora of Java**

1b – 2b – 3b – 4b – 12b – 13b – 14b – 17b – 18b – 19b – 20b – 21b – 22b – 23b – 24b – 25b  
– 26b – 27a – 28b – 29b – 30b – 31a – 32b – 74a – 75b – 76a – 77b – 104b – 106b – 107b –  
186b – 287b – 288b – 289a – 290b – 291a – 292b – 293b – 294a – 392b – 393b. familia 84.  
Myrtaceae. 1a – 2b – 3b – 7b – 8b – 9b – 10b. 9. *Syzygium*. 1a – 7b – 8b – 11b – 13b – 14b –  
15a – 16b – 18b – 20a. *Syzygium myrtifolium* (Roxb.) Walp., sinonim *Eugenia myrtifolia*  
Roxb., *Syzygium campallenum* Miq.

Deskripsi :

Habitus : Semak.  
Akar : Sistem akar tunggang.  
Batang : Percabangan monopodial, berkayu.  
Daun : Tunggal, berhadapan, lanset sampai jorong, panjang 4,8 – 5,2 cm, lebar 1,5 –  
2,1 cm, ujung meruncing, pangkal meruncing, tulang daun menyirip, tepi rata,  
berkulit; tangkai daun lk 3mm.  
Bunga : Majemuk, malai, di ujung dan ketiak daun, kelopak berbentuk tabung, daun  
kelopak 4 – 5, daun mahkota 4 – 5, stamen banyak, bakal buah tenggelam.  
Pustaka : Backer C.A. & Brink R.C.B. (1965): *Flora of Java* (Spermatophytes only).  
N.V.P. Noordhoff – Groningen – The Netherlands.

Madiara, 28 Mei 2018  
Tim determinasi  
  
Dra. Kartinah Wirjosoendjojo, SU.

## Lampiran 2. Surat keterangan identifikasi tanaman pucuk merah.



UNIVERSITAS GADJAH MADA  
FAKULTAS BIOLOGI  
LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN

Jalan Teknika Selatan Sekip Utara Yogyakarta 55281 Telpun (0274) 6492262/6492272; Fax: (0274) 580839

### SURAT KETERANGAN

Nomor : 01327/S.Tb./V/2018

Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi UGM, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa,


Nama : Anggriani Triliani Lona  
NIM : 15113375 A  
Asal instansi : Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

telah melakukan identifikasi tumbuhan dengan hasil sebagai berikut,

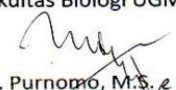
Kingdom : Plantae  
Divisio : Tracheophyta  
Class : Magnoliopsida  
Ordo : Myrtales  
Familia : Myrtaceae  
Genus : Syzygium  
Spesies : *Syzygium myrtifolium* Walp.  
Sinonim : *Eugenia myrtifolia* Roxb.  
*Eugenia oleina* Wight  
*Syzygium campanulatum* Korth.  
*Syzygium oleinum* Wall.  
Nama lokal : Pucuk merah

identifikasi tersebut dibantu oleh Abdul Razaq Chasani, S.Si., M.Si.  
Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Biologi  
Universitas Gadjah Mada

  
Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr.Sc.  
NIP. 197003261995121001

Yogyakarta, 11 Mei 2018  
Kepala Laboratorium  
Sistematika Tumbuhan  
Fakultas Biologi UGM

  
Dr. Purnogio, M.S.  
NIP. 195504211982031005



**Lampiran 3. Gambar daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) dan serbuk daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.).**



Gambar a. Daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.)



Gambar b. Serbuk daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.)

**Lampiran 4. Gambar alat penetapan kadar air (*Moisture Balance*) dan botol maserasi.**



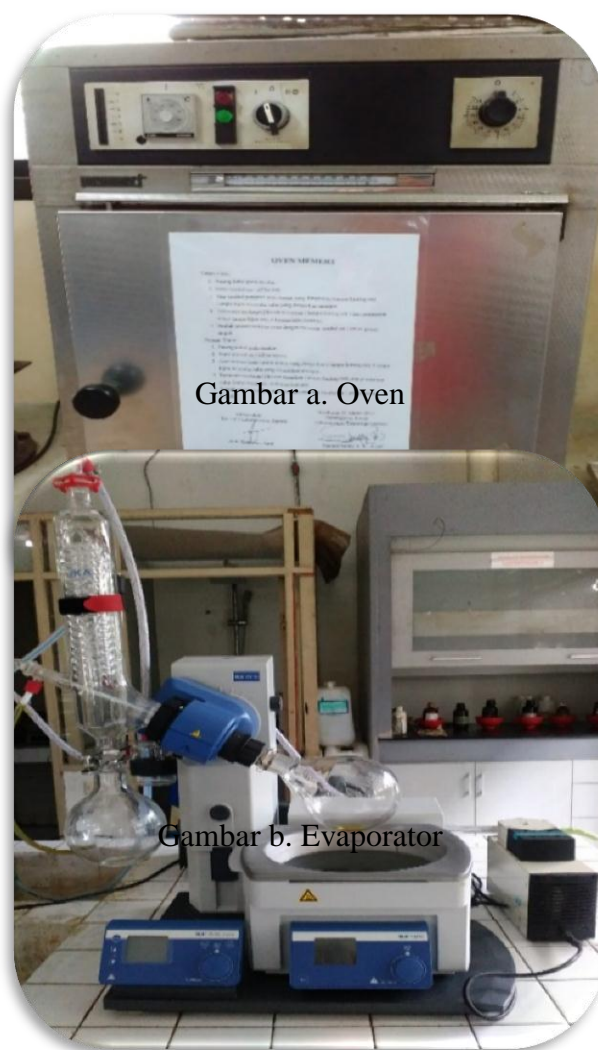
Gambar a. Penetapan kadar air (*Moisture Balance*)



**Lampiran 5. Gambar fraksinasi daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.).**



**Lampiran 6. Gambar alat oven dan evaporator.**



Gambar a. Oven

Gambar b. Evaporator



**Lampiran 7. Gambar Inkas, alat Vortex, timbangan, dan inkubator.**



Gambar a. Inkas



Gambar b. Vortex

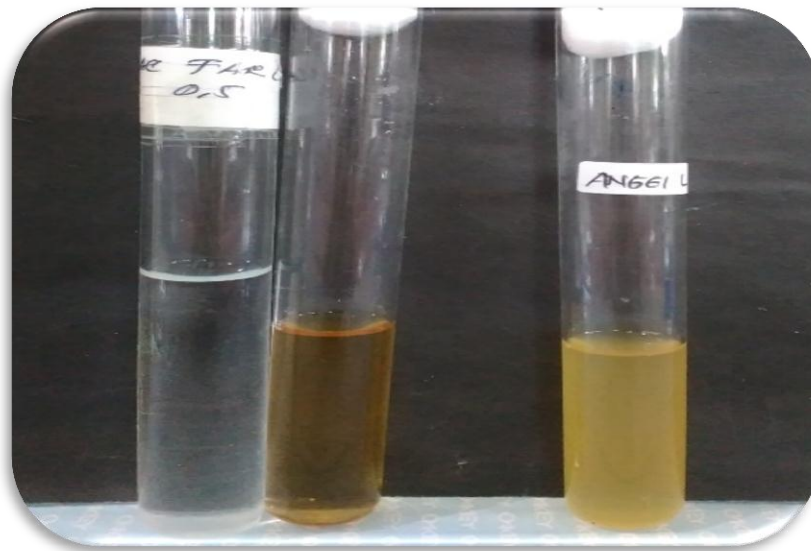


Gambar c. Timbangan



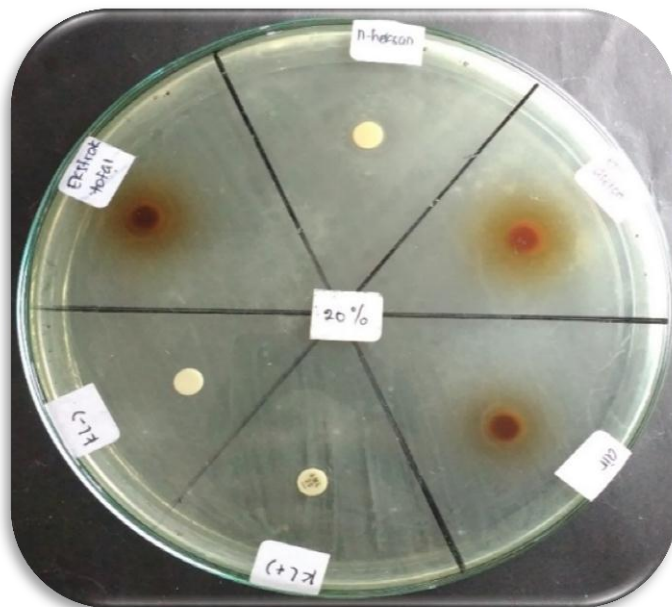
Gambar d. Inkubator

**Lampiran 8. Pembuatan suspensi bakteri uji dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI).**

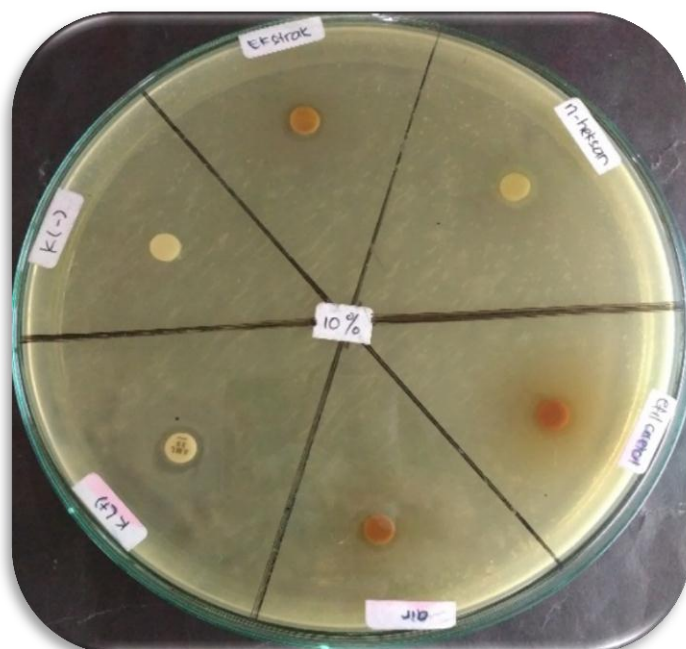


Gambar a. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

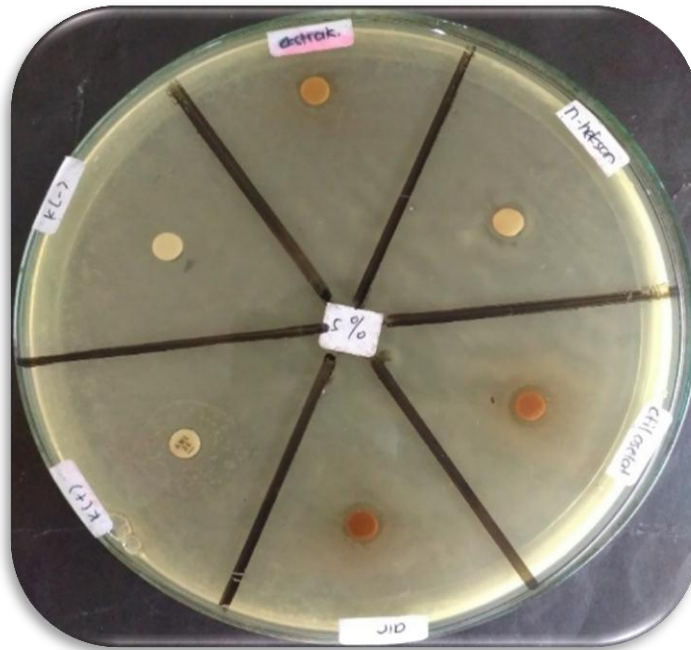
Lampiran 9. Gambar hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi.



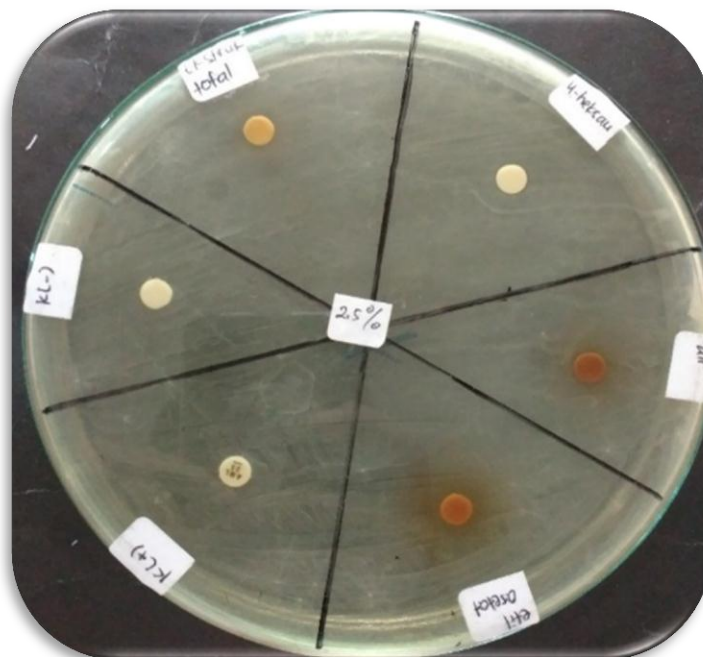
Gambar a. Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan konsentrasi 20%.



Gambar b. Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan konsentrasi 10%.

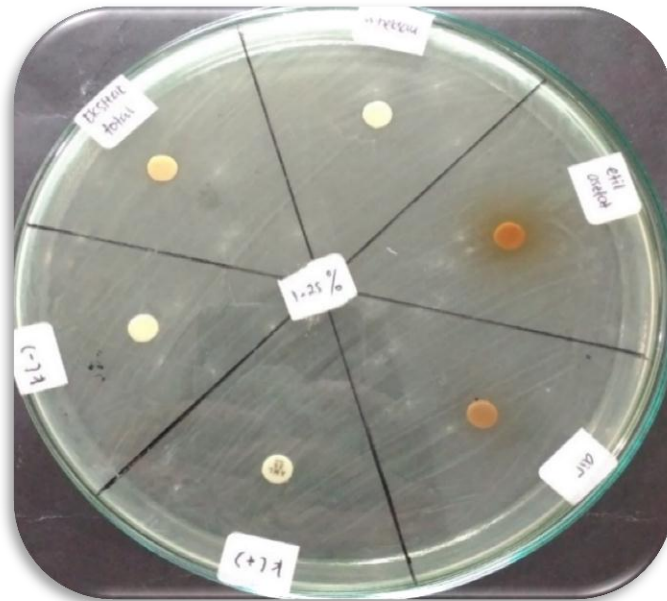


Gambar c. Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan konsentrasi 5%.



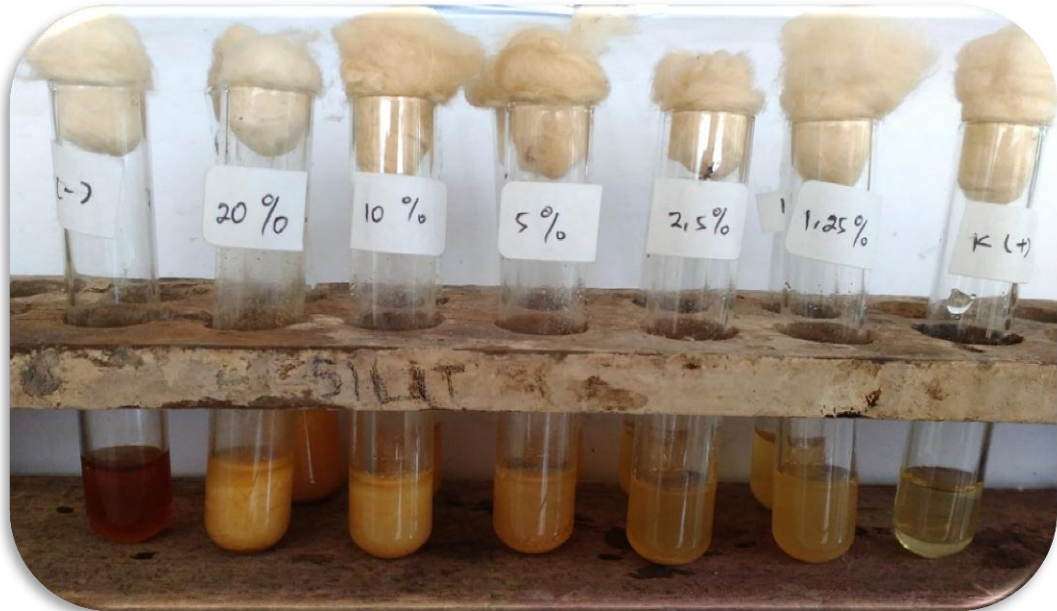
Gambar d. Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan konsentrasi 2,5%.



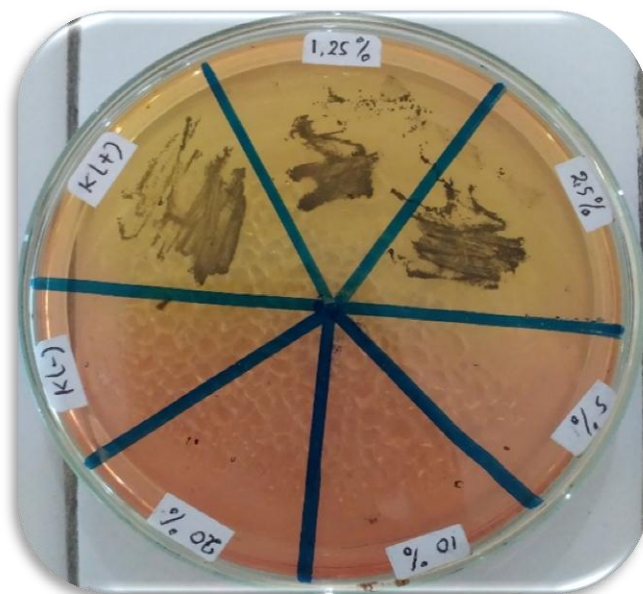


Gambar e. Uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan konsentrasi 1,25%.

**Lampiran 10.** Gambar hasil pengujian aktivitas antibakteri dan hasil inokulasi fraksi etil asetat daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara dilusi.



Gambar a. Hasil inkubasi fraksi etil asetat daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Gambar b. Hasil inokulasi fraksi etil asetat daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**Lampiran 11. Gambar hasil dan tabel hasil identifikasi senyawa.**

## ➤ Flavonoid



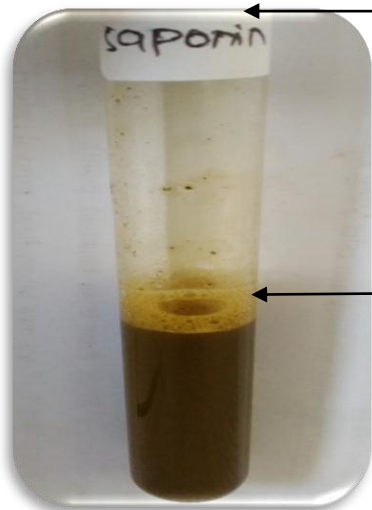
Terbentuknya warna jingga.

## ➤ Fenolik



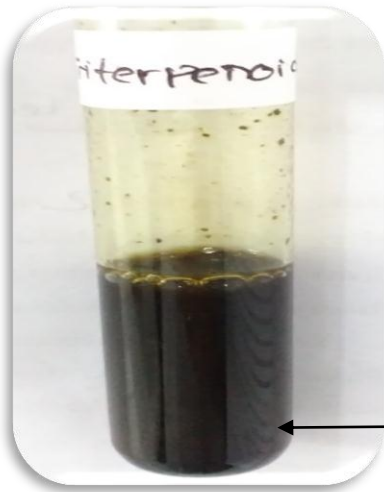
Terbentuknya hijau kehitaman.

## ➤ Saponin



Terbentuk buih selama  $\pm$  10 menit, dan di + HCl 2N buih tidak hilang.

➤ Triterpenoid



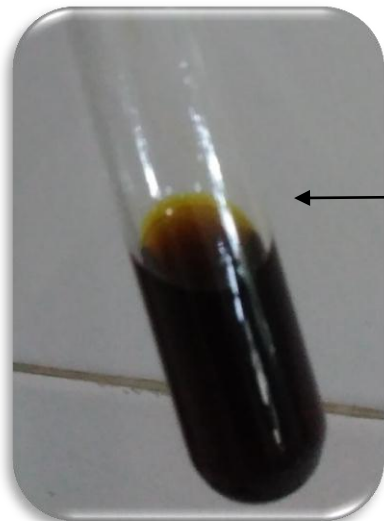
Berwarna merah  
berubah menjadi hijau.

➤ Alkaloid



Adanya endapan  
berwarna hitam.

➤ Minyak atsiri



Berbau harum khas  
minyak atsiri

**Tabel 8. Hasil identifikasi kandungan kimia.**

Kandungan kimia	Identifikasi	Reaksi positif identifikasi	Hasil uji
Triterpenoid	2 ml ekstrak + pereaksi Liebermann-Burchard yang terdiri dari 5 ml $C_4H_6O_3$ dan $H_2SO_4$ 5 tetes.	Terbentuknya warna merah.	Berwarna merah berubah menjadi hijau.
Minyak atsiri	2 ml ekstrak ditambah eter minyak tanah 5 tetes, dikocok, lalu dipanaskan.	Eter minyak tanah menguap, adanya minyak atsiri akan berbau harum.	Berbau harum.
Saponin	2 ml ekstrak + 10 ml air panas, kocok kuat selama 10 detik.	Terbentuknya buih yang mantap tinggi 1-10 cm + HCl 2N buih tidak hilang.	Terbentuk buih selama $\pm$ 10 menit + HCl 2N buih tidak hilang.
Flavonoid	2 ml ekstrak + 10 ml air panas + 0,1 gram Mg dan 5 tetes HCl pekat.	Reaksi positif adanya perubahan warna merah atau jingga.	Terbentuknya warna jingga.
Fenolik	2 ml ekstrak dilarutkan dengan $FeCl_3$ 1% dalam air atau etanol.	Reaksi positif adanya perubahan warna hijau, merah, biru, atau hitam yang pekat.	Terbentuknya hijau kehitaman.
Alkaloid	1 ml ekstrak + 2 ml HCl 2N kemudian dikocok, ditambah 5 tetes Dragendrof.	Terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam dengan penambahan Dragendrof.	Terbentuknya endapan berwarna hitam.

**Lampiran 12. Hasil prosentase bobot kering terhadap bobot basah.**

No	Parameter	Nilai
1.	Bobot basah	8.000 gram
2.	Bobot kering	2.400 gram
3.	Rendemen	30%

Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah sebagai berikut

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

$$\% \text{ bobot kering} = \frac{2.400 \text{ g}}{8.000 \text{ g}} \times 100\% = 30\%$$

Hasil perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) di atas yaitu 30%  $\frac{b}{b}$ .

**Lampiran 13. Hasil penetapan kadar air serbuk daun hijau pucuk merah  
(*Syzygium myrtifolium* Walp.).**

X	$\bar{x}$	$d =  x - \bar{x} $	$d =  x - \bar{x} ^2$
6,0		0	0
6,0	6	0	0
6,5		0,5	0,25
Rata-rata			0,25

$$SD = \sqrt{\frac{0,25}{3-1}}$$

$$= \sqrt{0,125}$$

$$SD = 0,354$$

$$2SD = 0,708$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{6,0+6,0+6,5}{3} = 6,16$$

Data ditolak apabila  $|x - \bar{x}| > SD$  dimana dicurigai  $|6,5-6| = 0,5 < 2SD$ , maka data dapat diterima.

**Lampiran 14. Hasil perhitungan rendemen ekstrak etanolik dan fraksi daun hijau pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.).**

**1. Rendemen ekstrak etanolik**

Parameter	Nilai
Bobot serbuk daun hijau pucuk merah	500 gram
Bobot ekstrak daun hijau pucuk merah	115,87 gram
Rendemen ekstrak	23,17 %

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen ekstrak etanol} &= \frac{\text{Bobot ekstrak (g)}}{\text{Bobot sampel (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{115,87 \text{ g}}{500 \text{ g}} \times 100\% = 23,17\% \end{aligned}$$

**2. Rendemen fraksi *n*-heksana**

Berat ekstrak (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat wadah + ekstrak (g)	Berat ekstrak (g)	Prosentase % ( $\frac{b}{b}$ )
30 gram	136,18	137,90	1,72	5,73

$$\text{Rumus} = \frac{\text{Bobot fraksi (g)}}{\text{Bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{1,72 \text{ g}}{30 \text{ g}} \times 100\% = 5,73 \% \left(\frac{b}{b}\right)$$

**3. Rendemen fraksi etil asetat**

Berat ekstrak (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat wadah + ekstrak (g)	Berat ekstrak (g)	Prosentase % ( $\frac{b}{b}$ )
30 gram	136,18	143,14	6,96	23,2

$$\text{Rumus} = \frac{\text{Bobot fraksi (g)}}{\text{Bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{6,96 \text{ g}}{30 \text{ g}} \times 100\% = 23,2 \% \left(\frac{b}{b}\right)$$

**4. Rendemen fraksi air**

Berat ekstrak (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat wadah + ekstrak (g)	Berat ekstrak (g)	Prosentase % ( $\frac{b}{b}$ )
30 gram	136,18	139,72	3,54	11,8

$$\text{Rumus} = \frac{\text{Bobot fraksi (g)}}{\text{Bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{3,54 \text{ g}}{30 \text{ g}} \times 100\% = 11,8 \% \left(\frac{b}{b}\right)$$



**Lampiran 15. Pembuatan larutan uji ekstrak dan fraksi daun hijau pucuk merah.**

1. Pembuatan larutan stok konsentrasi 20 %

Menimbang  $\pm 2$  gram ekstrak etanolik atau fraksi kemudian masing-masing ditambah DMSO 1% sebanyak 10 ml masukkan ke dalam vial.

- Ekstrak yang ditimbang sebanyak 2,151 gram

$$\frac{2,151 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 21,51\%$$

- Fraksi *n*-heksana yang ditimbang sebanyak 2,138 gram

$$\frac{2,138 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 21,38\%$$

- Fraksi etil asetat yang ditimbang sebanyak 2,057 gram

$$\frac{2,057 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 20,57\%$$

- Fraksi air yang ditimbang sebanyak 2,086 gram

$$\frac{2,086 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 20,86\%$$

2. Pembuatan larutan uji hasil ekstrak atau fraksinasi konsentrasi 10 % sebanyak 10 ml

$$\begin{aligned} 10\% &= 10\% \text{ b/v} \\ &= 10 \text{ gram}/100 \text{ ml} \\ &= 1 \text{ gram}/10 \text{ ml}. \end{aligned}$$

Ditimbang 1 gram fraksi dilarutkan dengan dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% sampai 10 ml.

- Ekstrak yang ditimbang sebanyak 1,039 gram

$$\frac{1,039 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 10,39\%$$

- Fraksi *n*-heksana yang ditimbang sebanyak 1,131 gram

$$\frac{1,131 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 11,31\%$$

- Fraksi etil asetat yang ditimbang sebanyak 1,081 gram

$$\frac{1,081 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 10,81\%$$

- Fraksi air yang ditimbang sebanyak 1,046 gram

$$\frac{1,046 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 10,46\%$$

3. Pembuatan larutan uji hasil ekstrak atau fraksinasi konsentrasi 5 % sebanyak 10 ml

$$\begin{aligned} 5\% &= 5\% \text{ b/v} \\ &= 5 \text{ gram}/100 \text{ ml} \\ &= 0,5 \text{ gram}/10 \text{ ml}. \end{aligned}$$

Ditimbang 0,5 gram fraksi dilarutkan dengan dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% sampai 10 ml.

- Ekstrak yang ditimbang sebanyak 0,571 gram

$$\frac{0,571 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 5,71\%$$

- Fraksi *n*-heksana yang ditimbang sebanyak 0,564 gram

$$\frac{0,564 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 5,64\%$$

- Fraksi etil asetat yang ditimbang sebanyak 0,539 gram

$$\frac{0,539 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 5,39\%$$

- Fraksi air yang ditimbang sebanyak 0,573 gram

$$\frac{0,573 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 5,73\%$$

4. Pembuatan larutan uji hasil ekstrak atau fraksinasi konsentrasi 2,5 % sebanyak 10 ml

$$\begin{aligned} 2,5\% &= 2,5\% \text{ b/v} \\ &= 2,5 \text{ gram}/100 \text{ ml} \\ &= 0,25 \text{ gram}/10 \text{ ml}. \end{aligned}$$

Ditimbang 0,25 gram fraksi dilarutkan dengan dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% sampai 10 ml.

- Ekstrak yang ditimbang sebanyak 0,263 gram

$$\frac{0,263 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 2,63\%$$

- Fraksi *n*-heksana yang ditimbang sebanyak 0,211 gram

$$\frac{0,211 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 2,11\%$$

- Fraksi etil asetat yang ditimbang sebanyak 0,245 gram

$$\frac{0,245 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 2,45\%$$

- Fraksi air yang ditimbang sebanyak 0,234 gram

$$\frac{0,234 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 2,34\%$$

5. Pembuatan larutan uji hasil ekstrak atau fraksinasi konsentrasi 1,25 % sebanyak 10 ml

$$\begin{aligned} 1,25\% &= 1,25\% \text{ b/v} \\ &= 1,25 \text{ gram}/100 \text{ ml} \\ &= 0,125 \text{ gram}/10 \text{ ml}. \end{aligned}$$

Ditimbang 0,125 gram fraksi dilarutkan dengan dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% sampai 10 ml.

- Ekstrak yang ditimbang sebanyak 0,140 gram

$$\frac{0,140 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 1,40\%$$

- Fraksi *n*-heksana yang ditimbang sebanyak 0,137 gram

$$\frac{0,137 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 1,37\%$$

- Fraksi etil asetat yang ditimbang sebanyak 0,134 gram

$$\frac{0,134 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 1,34\%$$

- Fraksi air yang ditimbang sebanyak 0,128 gram

$$\frac{0,128 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 100\% = 1,28\%$$

Keterangan: Untuk pengenceran fraksi air menggunakan aquadest steril.

## Lampiran 16. Komposisi dan pembuatan media

### 1. Media *Brain Heart Infusion*

#### Komposisi:

Calf brain infusion	200	gram
Beef heart infusion agar	250	gram
Proteosepepton atau glystate	10	gram
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O (Disodium Phospat)	2,5	gram
Dextrose	2	gram
Aquadest ad	1	liter
pH akhir 7,4 ± 0,2		

#### Cara Pembuatan:

1. Ditimbang 464,5 gram, masukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian larutkan dengan aquadest sebanyak 1 liter.
2. Media dipanaskan sampai mendidih agar tercampur dengan sempurna selama 1 menit.
3. Media dimasukkan dalam tabung atau botol kemudian sterilkan pada autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 1-2 atm, selama 15 menit.
4. Tunggu hingga suhu 45<sup>0</sup>C, lalu tuangkan media ke dalam tabung reaksi.

### 2. Media Nutrien Agar

#### Komposisi:

Ekstrak ragi	2	gram
Peptone	5	gram
NaCl (Natrium klorida)	5	gram
Agar	15	gram
Aquadest ad	1	liter
pH akhir 7,4 ± 0,2		

#### Cara pembuatan:

1. Ditimbang 27 gram media dan dilarutkan dalam sejumlah aquadest sesuai jumlah yang diinginkan.

2. Media dimasukkan dalam wadah tertutup seperti botol kaca *schots* dan gunakan *magnetic stirer* dengan suhu  $\pm 100^{\circ}\text{C}$  dan kecepatan 300 rpm.
3. Medium NA diaduk dan dipanaskan hingga agar larut sepenuhnya atau medium telah bening.
4. Setelah agar larut, masukkan medium ke dalam tabung reaksi @10 ml, lalu sumbat dengan kapas sampai rapat.
5. Medium disteril pada autoklaf pada tekanan 1,5 atm dan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama kurang lebih 15 menit.
6. Setelah sterilisasi, medium dapat dituang secara aseptis pada cawan petri. Sebelum menuang medium, tunggu hingga suam-suam kuku ( $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ).

### 3. Media *Vogel Johnson Agar*

Komposisi:

Glicyne	10	gram
Trypton	10	gram
Lithium Klorida	5	gram
Fenol merah	0,025	gram
Manitol	10	gram
Dipotassium Fosfat	5	gram
Ekstrak ragi	5	gram
Agar	15	gram

pH akhir  $7,2 \pm 0,2$

Cara pembuatan:

1. Ditimbang 60,025 gram media, lalu masukkan ke dalam Erlenmeyer.
2. Ditambahkan aquadest sampai volume mendekati 1 liter.
3. Diukur pH (7,0-7,4), lalu ditambahkan aquadest sampai 1 liter.
4. Dipanaskan di atas penangas air sambil sesekali di aduk hingga larut sempurna.
5. Diturunkan dari penangas air, bagikan ke dalam tabung @10 ml, lalu sumbat dengan kapas sampai rapat.
6. Disterilkan pada autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dalam waktu 15 menit.

7. Dikeluarkan dari autoklaf kemudian dituang ke cawan petri.
8. Ditambahkan 3 tetes kalium telurit 3,5% dan homogenkan.

#### 4. Media *Mueller Hinton Agar*

Komposisi:

Beef Extract	2	gram
Acid Hydrolysate of Casein	17,5	gram
Starch	1,5	gram
Agar	17	gram
Aquadest ad	1	liter

pH akhir  $7,3 \pm 0,1$  pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$

Cara pembuatan:

1. Ditimbang 38 gram media, tambahkan aquadest sampai 1 liter.
2. Dipanaskan sampai mendidih untuk melarutkan media.
3. Dituang pada tabung reaksi @10 ml lalu ditutup rapat menggunakan kapas.
4. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.
5. Tunggu sampai hangat-hangat kuku ( $45^{\circ}\text{C}$ - $50^{\circ}\text{C}$ ).
6. Waktu akan digunakan, tuang ke dalam cawan petri steril.
7. Disimpan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Lampiran 17. Perhitungan diameter hambat pada uji antibakteri daun hijau pucuk merah terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 secara difusi.**

Sediaan uji	Konsentrasi (%)	Diameter daya hambat (mm)			Rata-rata
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak etanolik	1,25	0	0	0	0
	2,5	9	10	9	9,33
	5	14	14	14	14,00
	10	17	18	16	17,00
	20	20	20	18	19,33
Fraksi <i>n</i> -heksana	1,25	0	0	0	0
	2,5	0	0	0	0
	5	9	9	7	8,33
	10	10	11	9	10,00
	20	10	11	10	10,33
Fraksi etil asetat	1,25	8	8	9	8,33
	2,5	14	16	16	15,33
	5	17	18	18	17,67
	10	18	19	19	18,67
	20	21	21	22	21,33
Fraksi air	1,25	7	7	7	7,00
	2,5	9	10	10	9,67
	5	10	12	12	11,33
	10	13	14	13	13,33
	20	14	16	15	15,00
Kontrol (+) amoksisilin	25 µg	17	19	19	18,33
Kontrol (-) negatif		0	0	0	0

\* Kontrol positif: Cakram amoksisilin 25 µg

1. Konsentrasi 20%

$$\text{Rata-rata zona hambat ekstrak etanolik} = \frac{20+20+18}{3} = 19,333 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi } n\text{-heksan} = \frac{10+11+10}{3} = 10,333 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi etil asetat} = \frac{21+21+22}{3} = 21,333 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi air} = \frac{14+16+15}{3} = 15 \text{ mm.}$$

2. Konsentrasi 10%

$$\text{Rata-rata zona hambat ekstrak etanolik} = \frac{17+18+16}{3} = 17 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi } n\text{-heksan} = \frac{10+11+9}{3} = 10 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi etil asetat} = \frac{18+19+19}{3} = 18,667 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi air} = \frac{13+14+13}{3} = 13,333 \text{ mm.}$$

## 3. Konsentrasi 5%

$$\text{Rata-rata zona hambat ekstrak etanolik} = \frac{14+14+14}{3} = 14 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi } n\text{-heksan} = \frac{9+9+7}{3} = 8,333 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi etil asetat} = \frac{17+18+18}{3} = 17,667 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi air} = \frac{10+12+12}{3} = 11,333 \text{ mm.}$$

## 4. Konsentrasi 2,5%

$$\text{Rata-rata zona hambat ekstrak etanolik} = \frac{9+10+9}{3} = 9,333 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi etil asetat} = \frac{14+16+16}{3} = 15,333 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi air} = \frac{9+10+10}{3} = 9,667 \text{ mm.}$$

## 5. Konsentrasi 1,25%

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi etil asetat} = \frac{8+8+9}{3} = 8,333 \text{ mm.}$$

$$\text{Rata-rata zona hambat fraksi air} = \frac{7+7+7}{3} = 7 \text{ mm.}$$



**Lampiran 17. Analisis statistik diameter zona hambat ekstrak etanolik dan fraksi daun hijau pucuk merah terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.**

**1. Uji normalitas**

**Tests of Normality**

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Diameter	Ekstrak	.214	15	.062	.863	15	.027
	Fraksi n-heksana	.279	15	.003	.742	15	.001
	Fraksi etil asetat	.210	15	.073	.869	15	.033
	Fraksi air	.132	15	.200*	.935	15	.325

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

Keterangan:

Data terdistribusi normal jika pada uji Shapiro-Wilk nilai signifikansi  $< 0,05$ , sehingga data penelitian ini ada yang tidak terdistribusi normal.

**2. Uji non paramtrik dengan Kruskal-Wallis Test**

**Kruskal-Wallis Test**

**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank
Diameter	Ekstrak	15	33.43
	Fraksi n-heksana	15	15.83
	Fraksi etil asetat	15	44.13
	Fraksi air	15	28.60
	Total	60	

### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Diameter
Chi-Square	20.500
df	3
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

Kesimpulan:

Data antar kelompok ada perbedaan signifikan antara kelompok jika nilai sig. < 0,05, sehingga data penelitian ini ada perbedaan signifikan antar kelompok.

### 3. Uji non parametrik dengan Mann-Whitney Test

#### Mann-Whitney Test

	Ekstrak etanolik	Fraksi <i>n</i> -heksana	Fraksi etil asetat	Fraksi air
Ekstrak etanolik		0,011*	0,084	0,288
Fraksi <i>n</i> -heksana	0,011*		0,000*	0,003*
Fraksi etil asetat	0,084	0,000*		0,002*
Fraksi air	0,288	0,003*	0,002*	

Tanda \* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan.

#### 3.1. Perbandingan antara kelompok ekstrak dan fraksi *n*-heksana.

Mann-Whitney Test

#### Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter	Ekstrak	15	19.50	292.50
	Fraksi <i>n</i> -heksana	15	11.50	172.50
	Total	30		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Diameter
Mann-Whitney U	52.500
Wilcoxon W	172.500
Z	-2.533
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.011 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties

b. Grouping Variable: Kelompok

### 3.2.Perbandingan antara kelompok ekstrak dan fraksi etil asetat.

Mann-Whitney Test

**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter	Ekstrak	15	12.73	191.00
	Fraksi etil asetat	15	18.27	274.00
	Total	30		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Diameter
Mann-Whitney U	71.000
Wilcoxon W	191.000
Z	-1.730
Asymp. Sig. (2-tailed)	.084
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.089 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

### 3.3.Perbandingan antara kelompok ekstrak dan fraksi air.

Mann-Whitney Test

**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter	Ekstrak	15	17.20	258.00
	Fraksi air	15	13.80	207.00
	Total	30		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Diameter
Mann-Whitney U	87.000
Wilcoxon W	207.000
Z	-1.063
Asymp. Sig. (2-tailed)	.288
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.305 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

**3.4. Perbandingan antara kelompok fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat.**

Mann-Whitney Test

**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter	Fraksi <i>n</i> -heksana	15	9.50	142.50
	Fraksi etil asetat	15	21.50	322.50
	Total	30		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Diameter
Mann-Whitney U	22.500
Wilcoxon W	142.500
Z	-3.757
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

**3.5. Perbandingan antara kelompok fraksi *n*-heksana dan fraksi air.**

Mann-Whitney Test

**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter	Fraksi <i>n</i> -heksana	15	10.83	162.50
	Fraksi air	15	20.17	302.50
	Total	30		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Diameter
Mann-Whitney U	42.500
Wilcoxon W	162.500
Z	-2.934
Asymp. Sig. (2-tailed)	.003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.003 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

### 3.6. Perbandingan antara kelompok fraksi etil asetat dan fraksi air.

Mann-Whitney Test

**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter	Fraksi etil asetat	15	20.37	305.50
	Fraksi air	15	10.63	159.50
	Total	30		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Diameter
Mann-Whitney U	39.500
Wilcoxon W	159.500
Z	-3.037
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

**4. Uji non parametrik konsentrasi ekstrak dan fraksi yang memiliki zona hambat mendekati kontrol positif (+) amoksisilin 25 µg.**

Kelompok	Konsentrasi (%)	Rata-rata	Sig. dengan Kontrol (+)
Ekstrak etanolik	5	14,00	0,034*
	10	17,00	0,178
	20	19,33	0,261
Fraksi etil asetat	2,5	15,33	0,043*
	5	17,67	0,361
	10	18,67	0,796
Fraksi air	20	21,33	0,043*
	5	11,33	0,043*
	10	13,33	0,043*
	20	15,00	0,046*

Tanda \* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan dengan kontrol positif.

**Mann-Whitney Test**

**1. Ekstrak 5%**

**Ranks**

kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
diameter Ekstrak 5%	3	2.00	6.00
Amoksisilin	3	5.00	15.00
Total	6		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	diameter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.121
Asymp. Sig. (2-tailed)	.034
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

## 2. Ekstrak10%

### Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
diameter	Ekstrak 10%	3	2.50	7.50
	Amoksisilin	3	4.50	13.50
	Total	6		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	diameter
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	7.500
Z	-1.348
Asymp. Sig. (2-tailed)	.178
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

## 3. Ekstrak 20%

### Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
diameter	Ekstrak 20%	3	4.33	13.00
	Amoksisilin	3	2.67	8.00
	Total	6		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	diameter
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.124
Asymp. Sig. (2-tailed)	.261
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

#### 4. Fraksi etil asetat 2,5%

##### Ranks

kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
diameter Fraksi etil asetat 2,5%	3	2.00	6.00
Amoksisilin	3	5.00	15.00
Total	6		

##### Test Statistics<sup>b</sup>

	diameter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.023
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

#### 5. Fraksi etil asetat 5%

##### Ranks

kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
diameter Fraksi etil asetat 5%	3	2.83	8.50
Amoksisilin	3	4.17	12.50
Total	6		

##### Test Statistics<sup>b</sup>

	diameter
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	8.500
Z	-.913
Asymp. Sig. (2-tailed)	.361
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok



**6. Fraksi etil asetat 10%****Ranks**

kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
diameter Fraksi etil asetat 10%	3	3.67	11.00
Amoksisilin	3	3.33	10.00
Total	6		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	diameter
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-.258
Asymp. Sig. (2-tailed)	.796
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

**7. Fraksi etil asetat 20%****Ranks**

kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
diameter Fraksi etil asetat 20%	3	5.00	15.00
Amoksisilin	3	2.00	6.00
Total	6		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	diameter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.023
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

**8. Fraksi air 5%****Ranks**

kelompok		N	Mean Rank	Sum of Ranks
diameter	Fraksi air 5%	3	2.00	6.00
	Amoksisilin	3	5.00	15.00
	Total	6		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	diameter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.023
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

**9. Fraksi air 10%****Ranks**

kelompok		N	Mean Rank	Sum of Ranks
diameter	Fraksi air 10%	3	2.00	6.00
	Amoksisilin	3	5.00	15.00
	Total	6		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	diameter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-2.023
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

**10. Fraksi air 20%****Ranks**

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
diameter	Fraksi air 20%	3	2.00	6.00
	Amoksisilin	3	5.00	15.00
	Total	6		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	diameter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok