

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR
DARI EKSTRAK ETANOL DAUN UNGU (*Graphthophyllum pictum* (L.) Griff.)
TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922**



Oleh :

**Amrina Malahati
19133857A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR
DARI EKSTRAK ETANOL DAUN UNGU (*Graphthophyllum pictum* (L.) Griff.)
TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922**

SKRIPSI

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

Oleh :

**Amrina Malahati
19133857A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul :

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR DAR
EKSTRAK ETANOLIK DAUN UNGU (*Graphitophyllum pictum* (L.) Griff.)
TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922**

Oleh:

**Amrina Malahati
19133857A**

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 12 Juni 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Prof. Dr. H. ... Ostari, SU., MM., M.Sc., Apt.

Pembimbing Utama

Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt

Pembimbing Pendamping

Ana Indrayati, M.Si., Dr.

Penguji :

1. Opstaria Saptarini, M.Si., Apt

1.

2. Ganet Eko Pramukantoro, M.Si., Apt

2.

3. Anita Nilawati, M.Farm., Apt

3.

4. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt

4.

PERNYATAAN

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

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

Surakarta, 12 Juni 2017



Amrina Malahati

HALAMAN PERSEMBAHAN

“Dengan Bismillah aku memulainya dan dengan Alhamdulillah aku
Mengakhirinya”

“Sesungguhnya sesudah ada kesulitan itu ada kemudahan”

(Qs. Al-Insyirah: 6)

“Barangsiapa bersungguh-sungguh, sesungguhnya kesungguhannya itu adalah
Untuk dirinya sendiri.”

(QS. Al-Ankabut: 6)

Kupersembahkan kepada :

- ❖ Allah SWT dan Rasul-Nya, yang telah memberikan petunjuknya kepadaku.
- ❖ Ayah, Mamah, Adek dan Kakak ku tersayang, keluargaku yang selalu memberikan dukungan, motivasi serta do'a.
- ❖ H.Rahmad yang selalu menemani disaat susah maupun senang dan selalu memberikan semangat serta do'anya.
- ❖ Sahabat-sahabatku, terimakasih untuk pengalaman, canda tawa, dan kebersamaan yang luar biasa.
 - Untuk tim skripsiku (Nora Ilham Suryaku, Maya, Syaiban) terimakasih atas kesabaran dalam membantu jalannya skripsi ini.
 - Untuk teman-teman teori 3, teori FKK 3, kos pink pak Didikdan seluruh angkatan 2013 kalian luar biasa.
 - Almamater, Agama, Bangsa dan Negara.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas berkat, rahmat, dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul: **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN UNGU (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff.) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922”** Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi Program Studi Ilmu Farmasi pada Universitas Setia Budi.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis banyak mendapat bimbingan, bantuan dan saran-saran yang berguna dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., Apt., Selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini
3. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan petunjuk, bimbingan dan arahan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
4. Ana indrayati, M. Si., Dr. selaku dosen pembimbing pendamping yang telah memberikan petunjuk, bimbingan dan arahan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Terima kasih kepada tim penguji yaitu Opstaria Saptarini, S.Farm. M.si., Apt. Ganet Eko Pramukantoro.,S.Farm.,M.Si.,Anita M.Si., Apt. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt.
6. Seluruh dosen, Asisten Dosen, Staff Perpustakaan dan Staff Laboratorium Universitas Setia Budi atas bantuannya selama penulis menempuh skripsi dan studi.
7. Kepada orang tua ku tercinta yang selalu memberikan motivasi, doanya dalam pembuatan skripsi ini.
8. Seluruh rekan mahasiswa Universitas Setia budi.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna karena keterbatasan kemampuan penulis, oleh sebab itu kritik dan saran sangat penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Selamat membaca dan semoga bermanfaat. Amin

Surakarta, Mei 2017

Amrina Malahati

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
INTISARI.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	2
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Kegunaan Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Tanaman Daun Ungu.....	4
1. Sistematika tanaman.....	4
2. Nama daerah.....	4
3. Morfologi tanaman	4
4. Kegunaan	4
5. Kandungan kimia	5
5.1. Flavonoid.....	5
5.2. Saponin.....	5
5.3. Tanin.....	6
5.4. Alkaloid.....	6
5.5. Steroid.....	6
B. Simplisia	7
1. Pengertian simplisia	7
2. Pengambilan simplisia.....	7

3.	Pengeringan simplisia.....	7
C.	Ekstraksi	8
1.	Pengertian ekstraksi.....	8
1.	Maserasi.....	9
2.	Maserasi.....	9
3.	Fraksinasi.....	9
4.	Pelarut.....	10
4.1	Etanol.....	10
4.2	<i>n</i> -Heksan.....	10
4.3	Etil asetat.....	11
4.4	Air.....	11
D.	Kromatografi Lapis Tipis	11
E.	Sterilisasi	13
F.	<i>Escherichia coli</i>	14
1.	Sistematika <i>Escherichia coli</i>	14
2.	Morfologi dan sifat	14
G.	Antibakteri.....	15
1.	Definisi antibakteri	15
2.	Mekanisme kerja antibakteri	15
H.	Uji Aktivitas Antibakteri	15
1.	Metode difusi.....	15
2.	Metode pengenceran dilusi.....	16
I.	Media.....	17
J.	Kotrimoksazol	17
K.	Landasan Teori	18
L.	Hipotesis	20
BAB III METODE PENELITIAN		21
A.	Populasi dan Sampel.....	21
B.	Variabel Penelitian	21
1.	Identifikasi variabel utama	21
2.	Klasifikasi variabel utama	21
3.	Definisi operasional variabel utama	21
C.	Bahan dan Alat	22
1.	Bahan.....	22
2.	Alat	23
D.	Jalannya Penelitian	23
1.	Determinasi dan identifikasi daun ungu.....	23
2.	Penyiapan bahan.....	23
3.	Penetapan Kadar Air	23
4.	Pembuatan ekstrak etanol daun ungu	24
5.	Pembuatan fraksi ekstrak etanol daun ungu	24
6.	Pengujian kandungan senyawa kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun ungu	24
6.1.	Saponin.....	24
6.2.	Tanin.....	25

6.3. Flavonoid. Sebanyak	25
6.4. Alkaloid.	25
6.5. Steroid.	25
7. Uji bebas etanol	25
8. Sterilisasi alat dan bahan	26
9. Identifikasi bakteri uji	26
9.1. Identifikasi bakteri uji secara makroskopis.	26
9.2. Identifikasi mikroskopis bakteri uji dengan pewarnaan Gram	26
9.3. Identifikasi bakteri uji secara biokimia	27
10. Pembuatan suspensi bakteri uji.....	28
11. Pengujian aktivitas antibakteri daun ungu secara difusi	28
12. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif secara dilusi	28
13. Identifikasi golongan senyawa pada fraksi teraktif secara Kromatografi Lapis Tipis	29
13.1 Identifikasi Flavonoid.	29
E. Analisis Data	29
F. Skema Jalannya Penelitian	30
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	35
1. Determinasi Tanaman Ungu (<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff.).....	35
2. Pembuatan serbuk daun ungu.....	35
3. Hasil penetapan kadar air serbuk daun ungu.....	35
4. Pembuatan ekstrak etanol daun ungu	36
5. Fraksinasi ekstrak etanol daun ungu	36
6. Identifikasi kandungan senyawa kimia dari serbuk, ekstrak dan fraksi teraktif daun ungu.....	37
7. Uji bebas etanol dari ekstrak daun ungu	38
8. Identifikasi bakteri <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	39
8.1. Identifikasi secara makroskopis	39
8.2. Identifikasi bakteri secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram	39
8.3. Hasil identifikasi biokimia	39
9. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi dari daun ungu dengan metode difusi.....	41
10. Pengujian Aktivitas Antibakteri secara Dilusi	44
11. Identifikasi Fraksi Teraktif dengan KLT.....	46
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	49
A. Kesimpulan.....	49
B. Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN.....	56

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun ungu	30
Gambar 2. Skema pembuatan suspensi bakteri.....	31
Gambar 3. Skema kerja uji aktivitas daun ungu terhadap <i>E. coli</i> ATCC 25922 secara difusi.....	32
Gambar 4. Skema kerja uji aktivitas fraksi teraktif ekstrak daun ungu terhadap <i>E. coli</i> ATCC 25922 secara dilusi.	33
Gambar 5. Skema penelitian.	34
Gambar 6. Profil kromatogram senyawa flavonoid, a) sinar tampak; b) UV 254 sebelum disemprot; c) UV 366 sebelum disemprot; d) sesudah disemprot sitroborat; e) UV 254 sesudah disemprot; f) UV 366 sesudah disemprot; g) x adalah quersetin; h) y adalah sampel.....	47

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Contoh beberapa pereaksi semprot.....	12
Tabel 2. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun ungu	35
Tabel 3. Penetapan kadar air serbuk dari daun ungu	36
Tabel 4. Hasil pembuatan ekstrak dari daun ungu.....	36
Tabel 5. Hasil total fraksi ekstrak dari daun ungu	37
Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun ungu	37
Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dari fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat dan air	38
Tabel 8. Hasil pengujian bebas metanol ekstrak daun ungu.....	38
Tabel 9. Identifikasi uji biokimia pada <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	40
Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri <i>E. coli</i> ATCC 25922 dengan metode difusi	43
Tabel 11. Hasil uji dilusi dari fraksi etil asetat dan antibiotik kotrimoksazol	45
Tabel 12. Hasil identifikasi senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat menggunakan KLT	46

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1.	Hasil determinasi daun ungu (<i>Graphitophyllum pictum</i> (L.) Griff .).....	57
Lampiran 2.	Tanaman dan serbuk daun ungu (<i>Graphitophyllum pictum</i> (L.) Griff .).....	58
Lampiran 3.	<i>Sterling-bidwell</i> , Inkubator dan Evaporator	59
Lampiran 4.	Maserasi dan hasil fraksi <i>n</i> -heksan dan etil asetat.....	60
Lampiran 5.	Foto ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air	61
Lampiran 6.	Foto hasil uji kandungan senyawa serbuk, ekstrak dan fraksi aetil asetat, <i>n</i> -heksan dan air.....	62
Lampiran 7.	Foto hasil uji kandungan senyawa ekstrak	63
Lampiran 8.	Foto hasil uji kandungan senyawa fraksi <i>n</i> -heksan	64
Lampiran 9.	Foto hasil uji kandungan senyawa fraksi etil asetat	65
Lampiran 10.	Foto hasil uji kandungan senyawa fraksi air	66
Lampiran 11.	Hasil presentase penetapan kadar air daun ungu	67
Lampiran 12.	Rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun ungu.....	68
Lampiran 13.	Rendemen ekstrak etanol daun ungu	68
Lampiran 14.	Hasil perhitungan rendemen total fraksinasi	69
Lampiran 15.	Hasil identifikasi bakteri <i>E. coli</i> ATCC 25922 makroskopis.....	70
Lampiran 16.	Hasil identifikasi bakteri <i>E. coli</i> ATCC 25922 mikroskopis.....	70
Lampiran 17.	Identifikasi biokimia pada <i>E. coli</i> ATCC 25922	70
Lampiran 18.	Pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat, dan air metode difusi	71
Lampiran 19.	Pembuatan konsentrasi fraksi etil asetat metode dilusi	72
Lampiran 20.	Pembuatan seri konsentrasi antibiotik kotrimoksazol menggunakan dilusi.....	73

Lampiran 21. Pembuatan Media	74
Lampiran 22. Foto hasil uji aktivitas antibakteri metode difusi	77
Lampiran 23. Foto hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat metode dilusi	78
Lampiran 24. Foto hasil uji aktivitas antibakteri kotrimoksazol metode dilusi....	79
Lampiran 25. Perhitungan Rf Kromatografi Lapis Tipis	80
Lampiran 26. Hasil analisis data uji ANOVA antara fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, ekstrak etanol daun ungu dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% serta kontrol (+) dan kontrol (-). 81	

INTISARI

MALAHATI, A., 2017, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN UNGU (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff.) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922 SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Infeksi merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita di Indonesia. Salah satu penyebab infeksi adalah bakteri *E. coli*. *E. coli* banyak ditemukan di usus besar manusia sebagai flora normal. Daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff.) adalah tanaman yang berkhasiat sebagai antibakteri (Riza 2010). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun ungu terhadap *E. coli* ATCC 25922.

Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96% kemudian difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah difusi dan dilusi. Konsentrasi ekstrak, fraksi etil asetat, *n*-heksan dan air yang digunakan pada metode difusi yaitu 50%, 25% dan 12,5%. Dilusi dilakukan menggunakan fraksi teraktif dari difusi.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak dan semua fraksi dari daun ungu memiliki aktivitas antibakteri. Fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dengan diameter zona hambat pada konsentrasi 50% berturut-turut yaitu 23,3 mm; 24 mm dan 23 mm. Uji aktivitas antibakteri metode dilusi menunjukkan KBM 12,5%.

Kata kunci : *Graptophyllum pictum* (L.) Griff., fraksi, *Escherichia coli*, difusi, dilusi

ABSTRACT

MALAHATI, A., 2017, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN UNGU (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff.) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922 SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Infection is a kind of disease that is mostly suffered in Indonesia. One of the cause of this infection is the *E. coli* bacteria. Most of the *E. Coli* can be found in the human's large intestine as a normal flora. The purple leaf (*Graptophyllum pictum* (L.) can be used as an antibacterial. This research is being done in purpose to find out the activity of this antibacterial from the *n*-hexane, ethyl acetate and water's fractions from the purple leaf's ethanol extract towards the *E. coli* ATCC 25922.

This study uses the maceration method using 96% ethanol and then been fractionated with the *n*-hexane, ethyl acetate, and water. The test method for the antibacterial activity that is used is the diffusion and dilution. The concentration of the ethyl acetate, *n*-hexane, and water of the purple leaf's ethanol extract which is used each of diffusion method is 50%, 25% and 12,5%. The dilution is done by using a fraction of the most active of the diffusion.

The test for the antibacterial activity using diffusion method the extract and the fractions of the purple leaf have the antibacterial activity. The ethyl acetate is the most active fraction. The diameter of the inhibition zone on the ethyl acetate fraction in the 50% concentration is 23,3 mm; 24 mm and 23 mm. The test for the antibacterial activity with the dilution method shows that the CMB is 12.5%.

Key Words : *Graptophyllum pictum* (L.) Griff., Fraction's, *Escherichia coli*, diffusion, dilution.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk di negara berkembang termasuk Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri (Radji 2010). Diare disebabkan karena infeksi yang menyebabkan frekuensi defekasi melebihi frekuensi normal dengan konsentrasi feses encer bahkan bercampur lendir dan darah. *E. coli* adalah salah satu penyebab diare akut baik anak-anak maupun orang dewasa karena mengkonsumsi air atau makanan yang tercemar oleh *E. coli* yang dapat menyebabkan infeksi pada usus dan dapat menyebabkan diare (Jawetz dkk 2007). Permasalahan infeksi dapat diatasi dengan menggunakan obat-obatan antibakteri dengan tujuan menghambat pertumbuhan bakteri dan membunuh bakteri tersebut.

Penggunaan obat tradisional telah menarik perhatian dan penggunaannya di kalangan masyarakat semakin meningkat. Tumbuhan merupakan salah satu bahan obat tradisional yang sudah lama digunakan. Masyarakat telah menerima dan membuktikan manfaat dan kegunaan tumbuhan obat dalam menjaga kesehatan. Tanaman obat adalah sumber yang dianggap mempunyai berbagai kandungan yang kaya dari agen kemoterapik untuk antibakteri. Tanaman obat yang poten untuk dikembangkan sebagai antibakteri diantaranya adalah daun ungu.

Daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff.) merupakan salah satu tanaman yang berkhasiat untuk mengobati berbagai penyakit. Kalsum dkk telah meneliti peran senyawa alkaloid yang terdapat dalam ekstrak etanol daun ungu yang memiliki efek analgesik, antiinflamasi dan menghambat pembentukan prostaglandin. Penelitian mengenai daun ungu sampai saat ini hanya pada uji efek farmakologinya saja (Kalsum dkk 1996).

Penelitian Riza (2010) menyatakan bahwa Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk ekstrak etanol daun ungu sebesar 0,23-0,47 µg/ml terhadap bakteri *E. coli*. Penelitian yang dilakukan oleh Riza (2010) ekstrak etanolik daun ungu menggunakan metode maserasi memiliki potensi terhadap *E. coli* dengan

membentuk diameter daerah hambat sebesar 12,55 mm pada konsentrasi 3,75 µg/ml. Daun ini mengandung senyawa kimia flavonoid, saponin, tanin, alkaloid dan steroid (Arifatin 1999).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka peneliti tertarik melakukan penelitian untuk menguji potensi dari fraksi-fraksi daun ungu terhadap pertumbuhan *E. coli*. Penelitian ini perlu dilakukan untuk menguji aktivitas fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak daun ungu terhadap *E. coli*. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan golongan senyawa dan menarik senyawa kimia yang mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* sesuai sifat kepolaran pelarut yang digunakan. Senyawa tersebut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda-beda, dimana senyawa flavonoid dan alkaloid bersifat semi polar, sedangkan saponin dan tanin bersifat polar sehingga digunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda pula.

Metode yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas dari *E. coli* menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa zona atau daerah yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap mikroorganisme yang diperiksa (Jawetz dkk 2007). Metode dilusi berguna untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan mengetahui kadar obat terendah yang dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan mikroorganisme (Bonang & Koeswardono 1982).

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas maka perumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut :

Pertama, apakah ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun ungu memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* ATCC 25922?

Kedua, manakah dari fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak daun ungu yang paling aktif terhadap *E. coli* ATCC 25922?

Ketiga, berapakah nilai KHM dan KBM dari fraksi teraktif ekstrak daun ungu yang paling aktif terhadap *E. coli* ATCC 25922?

C. Tujuan Penelitian

Pertama, untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun ungu terhadap *E. coli* ATCC 25922.

Kedua, mengetahui antara ketiga fraksi (*n*-heksan, etil asetat dan air) dari ekstrak daun ungu yang menghasilkan aktivitas antibakteri teraktif.

Ketiga, mengetahui nilai KHM dan KBM dari fraksi teraktif ekstrak daun ungu terhadap *E. coli* ATCC 25922.

D. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, informasi dan wawasan kepada seluruh lapisan masyarakat tentang aktivitas daun ungu untuk mengatasi masalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *E. coli* agar masyarakat bisa lebih memanfaatkan tanaman ini untuk pengobatan tradisional dan menambah informasi tentang sumber obat alami dari tumbuhan yang terdapat di Indonesia. Penelitian ini diharapkan berguna bagi peneliti lain sebagai acuan atau tambahan informasi dalam melakukan penelitian terhadap daun ungu sebagai antibakteri.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Daun Ungu

1. Sistematika tanaman

Sinonim	: <i>Graptophyllum hortense</i> Ness
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Solanales
Suku	: Acanthaceae
Marga	: Graptophyllum
Jenis	: <i>Graptophyllum pictum</i> Griff. (Hutapea 1994).

2. Nama daerah

Daun ungu mempunyai nama yang berbeda-beda dalam setiap daerah. Nama umum/dagang : Daun ungu, Sumatera : Pudim (Simalur), Jawa : Daun Ungu (Jawa Tengah), Handeleum (Sunda), Karaton (Madura), Bali : Temen, Maluku : Kadi-kadi (Ternate), Dongo-Idongo (Tidore) (Hutapea 1994).

3. Morfologi tanaman

Daun ungu merupakan habitus perdu, tinggi \pm 2 m. Batang berkayu, beruas permukaan licin, ungu kehijauan. Daun tunggal, berhadapan, bulat telur, ujung runcing, pangkal meruncing, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan atas mengkilap, panjang 15-25 cm, lebar 15-25 cm, lebar 5-11 cm, ungu, ungu tua. Bunga majemuk, di ujung batang, pangkal kelopak berkelatan, bagian ujung berbagi lima, ungu, benang sari empat, melekat pada mahkota bunga, tangkai sari ungu, kepala sari ungu kehitaman, putik bentuk tabung, ujung bertajuk lima, ungu. Buah kotak, lonjong, ungu kecoklatan. Akar tunggang, coklat muda (Hutapea 1994).

4. Kegunaan

Daun ungu berkhasiat sebagai peluruh kencing (diuretik), pencahar ringan (laksatif), dan pelembut kulit (emoliens) (Dalimartha 1999).

Penelitian menurut Kalsum dkk tentang peran senyawa alkaloid yang terdapat dalam ekstrak etanol daun ungu memiliki efek analgesik atau antiinflamasi dan menghambat pembentukan prostaglandin. Penelitian mengenai daun ungu sampai saat ini hanya pada uji efek farmakologinya saja (Kalsum dkk 1996).

5. Kandungan kimia

Daun ungu mengandung senyawa kimia flavonoid, saponin, tanin, alkaloid dan steroid (Arifatin 1999).

5.1. Flavonoid. Senyawa flavonoid diturunkan dari unit C_6-C_3 (fenil propana) yang bersumber dari asam sikimat (via fenilalanin) unit C_6 yang diturunkan dari jalur poliketida. Fragmen poliketida disusun dari tiga molekul malonil-KoA, yang bergabung dengan unit C_6-C_3 (sebagai KoA tioester) untuk membentuk unit awal triketida. Flavonoid yang berasal dari biosintesis gabungan terdiri atas unit-unit yang diturunkan dari asam sikimat dan jalur poliketida. Sifat fisika dan kimia senyawa flavonoid antara lain adalah larut dalam air, sedangkan dalam bentuk glikosida yang termetilasi larut dalam eter. Sebagai glikosida maupun aglikon, senyawa flavonoid tidak dapat larut dalam petroleum eter. Dari tumbuhan, glikosida dapat ditarik dengan pelarut organik yang bersifat polar (Heinrich dkk 2005).

Flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai respon terhadap infeksi mikroba, sehingga secara *in vitro* flavonoid efektif sebagai substansi antimikroba yang membunuh banyak mikroorganisme (Sari 2010).

5.2. Saponin. Saponin merupakan senyawa yang tersebar luas dalam tanaman, bersifat mirip sabun dan mudah membentuk busa. Saponin memiliki struktur mirip steroid sehingga penggunaan yang berlebihan dapat menyebabkan gejala-gejala serupa akibat penggunaan steroid yang berlebih, seperti hipertensi dan trombosis (Heinrich dkk 2005)

Saponin mempunyai efek membranolitik yaitu membentuk kompleks dengan kolesterol di membran sel protozoa. Saponin mempunyai efek antibakteri dan antijamur yang bagus. Efek antijamur dan antibakteri terganggu dengan adanya gugus monosakarida dan turunannya. Saponin dapat berfungsi sebagai detergen. Detergen memiliki struktur yang dapat berikatan dengan molekul

hidrofilik dan molekul-molekul organik non polar (lipofilik) sehingga mampu merusak membran sitoplasma dan membunuh mikroba (Cheeke 2000).

5.3. Tanin. Tanin merupakan kandungan tumbuhan yang bersifat fenol mempunyai rasa sepat dan dapat menyamak kulit. Tanin biasanya berupa senyawa amorf, higroskopis, berwarna coklat kuning yang larut dalam air (terutama air panas) membentuk larutan koloid bukan larutan sebenarnya. Tanin larut dalam pelarut organik yang polar, tetapi tak larut dalam pelarut organik non polar seperti benzena atau kloroform. Tanin terletak di dalam tumbuhan terpisah dari protein dan enzim sitoplasma, tetapi bila jaringan rusak dapat terjadi reaksi penyamakan (Harborne 1987).

Mekanisme tanin sebagai antibakteri adalah dengan menghambat enzim reverse transcriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk, selain itu tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna sehingga menyebabkan sel bakteri menjadi lisis (Rijayanti 2014).

5.4. Alkaloid. Alkaloid mempunyai kerangka dasar polisiklik termasuk cincin heterosiklik nitrogen serta mengandung substituen yang tidak terlalu bervariasi. Atom nitrogen alkaloid hampir selalu berada dalam bentuk gugus amin ($-NR_2$) atau gugus amida ($-CO-NR_2$) dan tidak pernah dalam bentuk gugus nitro (NO_2) atau gugus diazo. Sedangkan substituen oksigen biasanya ditemukan sebagai gugus fenol ($-OH$), metoksil ($-OCH_3$) atau gugus metilendioksi ($-O-CH_2-O$). Substituen-substituen oksigen ini dan gugus N-metil merupakan ciri sebagian besar alkaloida (Lenny 2006).

Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan sekunder yang terbesar. Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antimikroba. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mendenaturasi protein dan merusak membran sel (Robinson 1995).

5.5. Steroid. Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung siklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Dahulu sering digunakan sebagai hormon kelamin asam empedu, dll. Tetapi pada tahun-tahun terakhir ini makin banyak

senyawa steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan (Harborne 2006, Robinson 1995). Mekanisme steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom (Madduluri 2013).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan dengan tingkat kehalusan tertentu. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa bahan kimia murni. Simplisia pelican (mineral) adalah simplisia yang berupa bahan pelican (mineral) yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa bahan kimia murni (Gunawan & Mulyani 2004).

2. Pengambilan simplisia

Pengumpulan bahan baku merupakan tahapan penting dalam menentukan kualitas bahan baku yang akan digunakan. Dalam tahap ini faktor yang berperan penting adalah waktu panen. Waktu panen simplisia sangat berkaitan dengan senyawa aktif yang terkandung di dalam bagian tanaman yang akan di panen. Waktu panen yang tepat adalah ketika bagian tanaman yang akan digunakan mengandung senyawa aktif dalam jumlah yang maksimal (Depkes 1985).

3. Pengeringan simplisia

Pengeringan bertujuan menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang bisa menguraikan lebih lanjut kandungan zat aktif dan memudahkan dalam hal pengelolaan proses selanjutnya. Pengeringan secara alamiah dapat dilakukan dengan panas sinar matahari langsung, pengeringan alamiah lainnya dengan diangin anginkan dan tidak dipanaskan dibawah matahari langsung. Faktor-faktor

yang mempengaruhi proses pengeringan yaitu waktu pengeringan, suhu pengeringan, kelembaban udara dan kelembaban bahan, ketebalan bahan, sirkulasi udara dan luas permukaan bahan (Gunawan & Mulyani 2004). Pengeringan buatan umumnya menghasilkan simplisia dengan mutu lebih baik, karena hasil pengeringan yang lebih merata, waktu yang diperlukan relatif cepat dan tidak tergantung cuaca, kadar air dalam simplisia dapat ditekan serendah mungkin (Depkes 2008).

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, flavonoid, alkaloid dan lain-lain. Senyawa aktif yang diketahui terkandung dalam simplisia akan mempermudah pilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Depkes 2000).

Alkohol (metanol, etanol), aseton, dietil eter dan etil asetat adalah zat yang sering digunakan sebagai pelarut dalam proses ekstraksi, sebagai contoh ekstraksi asam fenolik yang sangat polar (benzoik, asam sinamik) disarankan mencampur pelarut dengan air, untuk zat yang kurang polar seperti minyak, asam lemak dan klorofil yang sering digunakan adalah diklorometan, kloroform, hexan atau benzen (Hastari 2012). Ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah waktu pengekstraksian, keasaman (pH), suhu dan perbandingan sampel dengan pelarut (Handa dkk 2008).

Ekstrak adalah sediaan yang dapat berupa kering, kental, atau cair, dibuat dengan cara menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang sesuai, yaitu maserasi, soxletasi, perkolasi atau penyeduhan dengan air mendidih. Cairan penyari yang dapat digunakan berupa air, eter atau campuran etanol dalam air (Anief 2003).

1. Maserasi

Penelitian ini menggunakan metode maserasi yang kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi.

2. Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Keuntungan maserasi mudah dilakukan, konsentrasi bahan ekstrak terjamin keseimbangannya, maserasi secara teoritis tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolut (Voigt 1995). Kerugiannya adalah pengerjaannya lama, membutuhkan pelarut yang banyak dan penyarian kurang sempurna. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes 2000).

Maserasi dapat dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok, dimasukkan dalam bejana lalu dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk, sari kemudian diencerkan dan ampas diperas. Ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian (Depkes 2000).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu cara pemisahan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran suatu senyawa. Pertama ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Masing-masing pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar lalu disari dengan pelarut semi polar kemudian dilanjutkan disari dengan pelarut polar (Harborne 1987).

Fraksinasi digunakan ekstraksi cair-cair yang bersifat sederhana, bersih, cepat dan mudah. Ekstraksi cair-cair adalah suatu teknik bila suatu larutan dibuat bersentuhan dengan suatu pelarut kedua (biasanya organik), yang pada hakekatnya tak tercampurkan dengan pelarut pertama dan menimbulkan perpindahan satu atau lebih zat terlarut ke dalam pelarut yang kedua. Pemisahan

dilakukan dengan cara digojok dalam sebuah corong pemisah selama beberapa menit. Faktor yang mempengaruhi dalam kesempurnaan ekstraksi adalah jenis pelarut dimana pelarut polar akan melarutkan lebih baik zat polar dan pelarut non polar juga akan melarutkan lebih baik untuk zat yang bersifat non polar. Volume pelarut, jumlah ekstraksi, dan pH juga mempengaruhi kesempurnaan dalam ekstraksi. Zat aktif yang digunakan pada umumnya bersifat asam lemah dan basa lemah dimana kelarutannya dipengaruhi oleh pH larutannya (Basset dkk 1994).

4. Pelarut

Pelarut umumnya adalah suatu cairan yang dapat berupa zat murni ataupun campuran. Zat yang terlarut dapat berupa gas, cairan lain, atau padat. Pemilihan pelarut penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Pelarut penyari yang baik harus memiliki kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif yakni hanya menarik zat aktif yang dikehendaki, tidak mempengaruhi zat aktif, serta diperbolehkan oleh peraturan. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi dipilih berdasarkan pada daya larut zat aktif dan zat yang tidak aktif (Ansel 1989). Pelarut yang digunakan adalah sebagai berikut:

4.1 Etanol. Etanol adalah penyari serbaguna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan (Harborne 1987). Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, antrakuinon, flavonoid, steroid, tanin dan saponin. Etanol tidak menyebabkan pembengkakan pada membran sel, memperbaiki stabilitas bahan obat pelarut. Keuntungan sifat lainnya yaitu mengendapkan bahan albumin dan menghambat kerja enzim. Umumnya berlaku sebagai cairan pengestraksi adalah campuran bahan pelarut yang berlainan, terutama campuran etanol-air. Etanol biasanya menghasilkan suatu bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengotornya hanya dalam skala kecil turut dalam cairan pengestraksi (Voight 1995). Etanol dipertimbangkan sebagai penyari karena lebih selektif, kapang dan khamir sulit tumbuh pada etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorbansinya baik, dapat bercampur dengan air segala perbandingan dan pemekatanya lebih mudah (Depkes 1986).

4.2 *n*-Heksan. *n*-heksan adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih terdiri dari suatu campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna

atau pucat, transparan, bersifat volatile, mudah terbakar, bau karakteristik, tidak dapat larut dengan air, dapat larut dengan alkohol, benzen, kloroform, eter (Tiwari dkk 2011). Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksan yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti lemak dan asam lemak tinggi, steroid, terpenoid, triterpenoid, dan karotenoid (Depkes 1987).

4.3 Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut semi polar, mudah terbakar dan menguap, maka disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas. Etil asetat merupakan suatu cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah, larut dalam 15 bagian air, dapat bercampur dalam eter, etanol dan kloroform (Depkes 1986). Senyawa yang dapat larut dalam pelarut ini adalah golongan alkaloid, flavonoid dan polifenol (Harborne 1987).

4.4 Air. Air merupakan pelarut yang sangat polar digunakan untuk menyari senyawa organik polar sehingga cocok untuk pelarut polar dalam proses fraksinasi. Air dapat melarutkan garam alkaloid, tanin, saponin, gula, gom, pati, protein, enzim, zat warna dan asam organik. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan selain zat aktif ikut tersari juga zat lain yang tidak diperlukan mengganggu proses penyarian. Air dipertimbangkan sebagai pelarut sebab murah dan mudah diperoleh, stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun, dan alamiah. Air dapat melarutkan enzim sehingga enzim yang terlarut dengan adanya air akan menyebabkan reaksi enzimatik, yang mengakibatkan penurunan mutu, tetapi adanya air akan mempercepat proses hidrolisis (Depkes 1986).

D. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk pemisahan senyawa secara cepat dengan menggunakan zat penjerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca (Depkes RI 1979). Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan cara pemisahan senyawa dari campuran senyawa lain, agar menjadi senyawa murninya. Kelebihan KLT adalah keserbagunaan, kecepatan, dan kepekaan. Keserbagunaan KLT dikarenakan bahwa selain selulosa, sejumlah penyerap lain dapat disapukan pada pelat kaca atau penyangga lain. Meskipun silika gel yang paling banyak digunakan, kecepatan KLT

dipengaruhi oleh sifat penyerap yang lebih padat bila disapukan pada pelat. Kekurangan KLT adalah kerja penyaputan pelat kaca dengan penyerap, bubuk silika gel yang harus dikocok kuat-kuat tiap jangka waktu tertentu, pengeringan pada suhu kamar dan pengaktifan dengan pemanasan pada suhu 100°C - 110°C selama 30 menit (Harborne 1987).

Pemisahan komponen kimia berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi yang melibatkan dua fase yaitu sifat fase diam atau sifat lapisan dan sifat fase gerak atau campuran pelarut pengembang. Komponen kimia dapat bergerak naik mengikuti fase gerak karena adanya daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia yang berbeda sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya, hasil inilah yang menyebabkan terjadinya pemisahan (Stahl 1985). Fase diam dapat berupa serbuk halus berfungsi sebagai permukaan penyerap dan sebagai penyangga untuk lapisan zat cair. Cara deteksi bercak dapat dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dengan pereaksi semprot khusus untuk senyawa tertentu (Sudjadi 1986).

**Tabel 1. Contoh beberapa pereaksi semprot
(Sarker dkk 2005) :**

No	Pereaksi semprot	Senyawa
1	<i>Vanilin / Sulfuric acid</i>	Merupakan pereaksi universal, salah satunya dapat digunakan untuk senyawa terpen dengan memberi warna merah & biru
2	<i>Phosphomolybdic acid (PMA)</i>	Terpen memberi warna biru pada latar belakang kuning
3	<i>Ammonium molybdate (VI)</i>	Merupakan peraksi universal, salah satunya dapat digunakan untuk senyawa diterpen dengan memberi warna biru
4	<i>Antimony (III) cholride</i>	Diterpen dan triterpen memberi warna merah kebiruan
5	<i>Tin (IV) cholride</i>	Flavonoid dan terpen
6	<i>Dragendrof's</i>	Alkaloid tetapi juga dapat digunakan untuk nonalkaloid seperti iridoids dan beberapa flavonoid. Alkaloid berwarna <i>orange</i> gelap kemerahan
7	<i>2,4 Dinitro-phenyl-hydrazine,</i>	Aldehid dan keton memberi warna kuning kemerahan
8	<i>Perchloric acid</i>	Merupakan peraksi universal, tetapi biasanya digunakan untuk senyawa steroid dan triterpen
9	<i>Borntrager</i>	Kumarin dan antrakuinon
10	<i>Ninhydrin</i>	Asam amino, amin, dan alkaloid. Alkaloid berwarna merah

E. Sterilisasi

Alat atau bahan dikatakan steril bila bahan atau alat tersebut bebas dari mikroba, baik dalam bentuk vegetatif maupun bentuk spora. Tindakan untuk membebaskan alat atau media dari jasad renik disebut dengan sterilisasi (Widyarto 2009). Sterilisasi dalam mikrobiologi merupakan proses penghilangan semua jenis organisme hidup, dalam hal ini adalah mikroorganisme (protozoa, fungi, bakteri, mycoplasma, virus) yang terdapat pada suatu benda. Proses ini melibatkan proses fisik dengan tujuan untuk membunuh atau menghilangkan mikroorganisme.

Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu sterilisasi panas basah dengan perebusan menggunakan air mendidih 100°C selama 10 menit efektif untuk sel-sel vegetatif dan spora eukariot, namun tidak efektif untuk endospora bakteri. Sterilisasi panas kering berfungsi untuk mematikan organisme dengan cara mengoksidasi komponen sel ataupun mendenaturasi enzim. Metode ini tidak dapat digunakan untuk bahan yang terbuat dari karet atau plastik, waktu sterilisasinya lama (sekitar 2-3 jam) dan berdaya penetrasi rendah. Metode sterilisasi kering ini tidak memerlukan air sehingga tidak ada uap air yang membasahi alat atau bahan yang disterilkan.

Penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar uv untuk bahan yang tidak akan berubah akibat temperatur tinggi atau tekanan tinggi, sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan desinfektan memiliki daya antimikroba yang lebih rendah dibandingkan metode sterilisasi yang lain. Bakteri pembentuk spora dan beberapa virus resisten terhadap sterilisasi dengan metode ini. Penggunaan larutan alkohol efektif membunuh bakteri dan fungi namun tidak dapat membunuh endospora dan virus. Sterilisasi dengan penyaringan digunakan untuk bahan yang sensitif terhadap panas, misalnya enzim. Pada proses ini digunakan membran filter yang terbuat dari selulosa asetat. Kerugian prosedur ini adalah biaya yang mahal (Pratiwi 2008).

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan oven pada suhu 170°C-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-

alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanas api langsung sterilisasi inkas menggunakan formalin (Suriawiria 1986).

F. *Escherichia coli*

1. Sistematika *Escherichia coli*

Klasifikasi *Escherichia coli* sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Fillum	: Proteobakteria
Kelas	: Gamma Proteobakteria
Ordo	: Enterobakteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i> (Todar 2008)

E. coli berbentuk batang pendek termasuk bakteri Gram negatif yang membentuk rantai. Keadaan pembiakan yang tidak cocok dapat terjadi bentuk filamen yang panjang, jarang terjadi kapsul, terjadi pergerakan pada sebagian strain *E. coli* (Jawetz dkk 2001).

E. coli biasanya tumbuh bergerombol serta dapat tumbuh pada berbagai macam kondisi. *E. coli* hidup di dalam saluran pencernaan manusia dan hewan sebagai flora normal (Dobrint 2005). *E. coli* seperti Gram negatif lainnya dapat mensintesis semua asam amino yang dibutuhkan. Manifestasi klinik oleh *E. coli* tergantung pada tempat infeksi. Beberapa penyakit klinik yang disebabkan oleh *E. coli* adalah infeksi saluran kemih, diare, sepsis dan meningitis (Jawetz dkk 2001).

2. Morfologi dan sifat

E. coli merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang, berderet, dan merupakan flora paling banyak diusus, bergerak dengan flagel. Galur *E. coli* dapat menghasilkan enterotoksin yang tidak panas, yang dapat meningkatkan sekresi air dan klorida dalam lumen usus dan menyebabkan hipermotilitas yang akan menyebabkan diare ringan pada anak-anak (Jawetz dkk 1986).

Kebanyakan galur tidak bersifat membahayakan, tetapi ada pula yang bersifat patogen terhadap manusia antara lain enteropatogenik *E. coli* (EPEC),

Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC). *E. coli* O157:H7 merupakan tipe EHEC yang terpeting dan berbahaya terkait dengan kesehatan masyarakat. *E. coli* pada umumnya tidak menyebabkan penyakit apabila telah mencapai jaringan luar traktus intestinalis seperti saluran kencing, paru, saluran empedu, peritoneum dan selaput otak. (Jawetz dkk 1986).

G. Antibakteri

1. Definisi antibakteri

Antibakteri adalah suatu zat yang dapat menghambat pertumbuhan dan menekan bakteri. Zat yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri penyebab infeksi pada manusia harus mempunyai sifat toksisitas selektif. Sifat toksisitas selektif ada yang mempunyai aktivitas bakteriostatik yaitu bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, sedangkan yang mempunyai aktivitas bakterisid yaitu bersifat membunuh bakteri (Ganiswara 1995).

2. Mekanisme kerja antibakteri

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi menjadi 5 kelompok yaitu penghambatan metabolisme sel bakteri, penghambatan sintesis dinding sel, perubahan permeabilitas membran sel, penghambatan sintesis protein dan penghambat sintesis asam nukleat (Ganiswara 1995).

H. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas suatu zat digunakan untuk mengetahui apakah zat tersebut dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan berbagai metode, yang biasanya digunakan adalah metode difusi dan dilusi atau pengenceran (Bonang dan Koeswardono 1982).

1. Metode difusi

Metode difusi merupakan metode yang paling sering digunakan. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa warna jernih yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap mikroba yang diperiksa (Jawetz dkk 2007). Metode ini dapat

dilakukan dengan tiga cara yaitu metode silinder, metode sumuran dan metode cakram kertas/*disc diffusion*. Metode sumur yaitu membuat sumuran pada agar padat yang telah diinokulasi mikroba. Sumuran pada media yang telah dibuat diinjeksikan dengan ekstrak yang akan diuji selanjutnya diinkubasi dan dilakukan pengamatan pertumbuhan mikroba untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling sumuran (Kusmayati & Agustini 2007).

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

2. Metode pengenceran dilusi

Metode dilusi berguna untuk mencari KHM dan KBM dengan mengetahui kadar obat terendah yang dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan mikroba (Bonang & Koeswardono 1982). Prinsip metode dilusi adalah senyawa antimikroba yang diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi. Masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi mikroba uji dalam media cair yang kemudian diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan mikroba yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Larutan uji senyawa antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa ada pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM, selanjutnya KHM tersebut dikultur ulang pada media agar tanpa penambahan mikroba uji ataupun senyawa antimikroba, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Media agar yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi 2008).

Keuntungan metode dilusi adalah dapat diketahui KHM dan KBM. Bahan uji pada metode dilusi cair bahan uji lebih mudah berinteraksi dengan bakteri

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

I. Media

Media adalah suatu bahan atau campuran bahan yang digunakan untuk menumbuhkan dan mengembang biakkan mikroba. Media yang digunakan harus dalam keadaan steril, tidak ditumbuhi mikroba lain yang tidak diharapkan (Suriawiria 1986). Media tumbuh mikroba harus mengandung semua nutrien yang mudah digunakan mikroba, mempunyai tekanan osmose, tegangan permukaan dan pH yang sesuai, media tidak mengandung zat-zat penghambat dan media harus steril (Suryono 1995).

Media biakan yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme dalam bentuk padat, semi padat, dan cair. Media padat diperoleh dengan cara menambahkan agar. Agar berasal dari alga/ganggang yang berfungsi sebagai bahan pematat. Alga digunakan karena tidak diuraikan oleh mikroorganisme, dan dapat membeku pada suhu diatas 45°C (Waluyo 2005). Media padat juga dapat digunakan untuk mengamati bentuk atau morfologi koloni serta mengisolasi biakan murni. Media semi padat biasanya digunakan untuk menguji ada tidaknya motilitas pergerakan mikroba maupun kemampuan fermentasi sedangkan media cair dapat digunakan untuk berbagai keperluan, seperti pembiakan organisme dalam jumlah besar dan fermentasi (Pratiwi 2008).

J. Kotrimoksazol

Trimetorpin dan sulfamektazol menghambat reaksi enzimatik obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi kedua obat memberikan efek sinergis. Penemuan sediaan kombinasi ini merupakan kemajuan

penting dalam usaha meningkatkan efektifitas klinik antimikroba. Kombinasi ini lebih dikenal dengan kotrimoksazol (Ganiswarna 1995).

Spektrum antibakteri trimetorpin sama dengan sulfametoksazol, meskipun daya antibakterinya 20-100 kali lebih kuat dari pada sulfometoksazol. Mikroba yang peka terhadap kombinasi trimetorpin-sulfametoksazol salah satunya adalah *E. coli*. Kedua komponen memperlihatkan interaksi sinergistik. Kombinasi ini mungkin efektif walaupun mikroba telah resisten terhadap sulfonamide dan agak resisten terhadap trimetorpin. Sinergisme maksimum akan terjadi bila mikroba peka terhadap dua komponen (Ganiswarna 1995).

Aktivitas antibakteri kotrimoksazol berdasarkan atas kerjanya pada dua tahap yang berurutan dalam reaksi enzimatik untuk membentuk asam tetrahidrofolat. Sulfametoksazol menghambat masuknya molekul PABA ke dalam molekul asam folat dan trimethoprim menghambat terjadinya reaksi reduksi dari hidrofolat menjadi tetrahidrofolat. Tetrahidrofolat penting untuk reaksi-reaksi pemindahan satu atom C, seperti pembentukan basa purin (adenine, guanine, dan timidin) dan beberapa asam amino (metionin, glisin) (Ganiswara 1995).

Frekuensi terjadinya resistensi terhadap kotrimoksazol lebih rendah dari pada masing-masing obat, karena mikroba yang resisten terhadap salah satu komponen lebih peka terhadap komponen lainnya. Resistensi mikroba terhadap trimertopin dapat terjadi karena mutasi. Resistensi yang terjadi pada gram negatif disebabkan oleh adanya plamid yang membawa sifat menghambat kerja obat terhadap enzim dihidrofolat reduktase (Ganiswarna 1995).

K. Landasan Teori

Graptophyllum pictum (L) Griff yang dikenal dengan nama daun ungu merupakan salah satu tumbuhan yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia sejak dulu untuk mengobati beberapa penyakit, seperti: peluruh kencing, mengobati bisul, pencahar ringan (*mild laxative*) dan pelembut kulit (*emolient*). Daun dapat digunakan untuk sembelit dan wasir (Hariana, 2007). Daun ini mengandung senyawa kimia flavonoid, saponin, tanin, alkaloid dan steroid (Arifatin 1999).

Penelitian yang dilakukan oleh Riza (2010) menunjukkan ekstrak etanol daun ungu memiliki potensi terhadap *E. coli* dengan membentuk diameter daerah hambat sebesar 12,50 mm pada konsentrasi 3,75 µg/ml. Penelitian tersebut diketahui bahwa ekstrak etanol daun ungu memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, akan tetapi penelitian tersebut belum sampai tahap fraksinasi. Penelitian ini dilanjutkan sampai fraksinasi sehingga dapat diketahui fraksi teraktif terhadap *E. coli*. Metode ekstraksi yang akan digunakan terhadap daun ungu adalah maserasi. Hasil dari ekstraksi kemudian dilanjutkan fraksinasi untuk mendapatkan fraksi yang aktif.

Fraksinasi adalah suatu cara pemisahan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran suatu senyawa (Harborne 1987). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol, *n*-heksan, etil asetat, dan air. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, antrakuinon, flavonoid, steroid, tanin dan saponin (Voight 1995). Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksan yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti lemak dan asam lemak tinggi, steroid, terpenoid, triterpenoid, dan karotenoid (Depkes 1987). Etil asetat merupakan pelarut semi polar dan senyawa yang dapat larut dalam pelarut ini adalah golongan alkaloid, flavonoid dan polifenol (Harborne 1987). Air adalah pelarut polar dan senyawa yang dapat larut dalam air yaitu garam alkaloid, tanin, saponin, gula, gom, pati, protein, enzim, zat warna dan asam organik (Depkes 1986).

Daun ungu memiliki familia yang sama dengan daun jeruju yaitu Acanthaceae. Daun ungu dan daun jeruju mengandung senyawa yang sama yaitu flavon dan flavanol (3- hidroksi tersubstitusi) (Isnawati dkk 2003; Djamil dkk 2010). Penelitian oleh Riza (2010) ekstrak etanol daun ungu menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* yaitu 12,55 mm dan Saptiani dkk (2013) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak daun jeruju mempunyai daya hambat terbaik terhadap bakteri *Vibrio harveyi* yaitu 12 mm pada konsentrasi 700 ppm. Berdasarkan penelitian tersebut dapat diperoleh suatu kemungkinan bahwa daun jeruju dan daun ungu mempunyai beberapa kesamaan yaitu masih dalam satu familia, mengandung senyawa yang sama yaitu flavon dan

flavonol juga mempunyai aktivitas antibakteri yang mana secara kemotaksonomi suatu familia yang sama kemungkinan mempunyai kandungan kimia dengan sifat yang hampir sama. Daun jeruju menurut penelitian didapatkan fraksi teraktifnya adalah etil asetat yang mengandung flavon sebagai antibakteri, kemungkinan flavon dan flavonol yang dikandung oleh daun ungu juga mempunyai daya antibakteri dimana flavon dan flavonol bersifat semi polar yang larut di etil asetat.

Dalam penelitian ini peneliti menggunakan antibiotik kotrimoksazol sebagai kontrol pembanding yang merupakan kombinasi dari trimethoprim dan sulfametaksazol yang menghambat reaksi enzimatis obligat pada dua tahap berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi dari kedua obat memberikan efek sinergis (Ganiswara 1995).

Metode untuk pengukuran aktivitas antibakteri pada penelitian ini dilakukan dengan metode difusi dan dilusi. Metode difusi adalah suatu uji aktivitas dengan menggunakan cakram atau suatu silinder yang tidak beralas, yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada perbenihan padat yang telah ditanami dengan biakan tebal bakteri yang diperiksa. Luas daerah yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri yang diperiksa (Jawetz dkk 1986). Metode dilusi adalah metode yang mendasarkan pengamatan kekeruhan larutan, dimana dengan metode ini dapat ditentukan KHM dan KBM (Bonang dan Koewandono 1982).

L. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori di atas, hipotesis dalam penelitian ini adalah :

Pertama, ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun ungu memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* ATCC 25922.

Kedua, fraksi etil asetat ekstrak daun ungu merupakan fraksi yang paling aktif terhadap *E. coli* ATCC 25922.

Ketiga, dapat menentukan nilai KHM dan KBM dari fraksi teraktif ekstrak daun ungu terhadap *E. coli* ATCC 25922.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah daun ungu yang diperoleh dari B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel daun ungu yang diambil secara acak tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda yang masih segar diperoleh dari B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan November 2016.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian yang pertama adalah ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun ungu.

Variabel utama yang kedua adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak serta fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air terhadap *E. coli* ATCC 25922.

2. Klasifikasi variabel utama

Pengklasifikasian variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat digolongkan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol dari daun ungu, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah bakteri, media, suhu inkubasi, waktu inkubasi, sterilisasi dan kondisi laboratorium. Variabel tergantung dalam penelitian adalah diameter zona hambat yang terbentuk dari pemberian ekstrak serta fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air daun ungu.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun ungu yang diambil adalah daun segarnya yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua diperoleh dari B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian dan

Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun ungu adalah daun ungu yang diambil kemudian dicuci, dipotong, dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C lalu dihaluskan, kemudian serbuk diayak dengan ayakan no. 40.

Ketiga, ekstrak daun ungu adalah hasil ekstraksi serbuk daun ungu dengan pelarut etanol menggunakan metode maserasi.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah ekstrak daun ungu yang kemudian difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu fraksi *n*-heksan dari daun ungu yang kemudian difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah residu fraksi etil asetat dari daun ungu.

Ketujuh, *E. coli* adalah bakteri *E. coli* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Delapan, uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi adalah metode yang digunakan untuk mengukur zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk. Metode dilusi adalah metode yang digunakan untuk menentukan KHM dan KBM dengan membuat berbagai seri konsentrasi dengan cara penapisan sampai konsentrasi akhir.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan utama yang digunakan penelitian ini adalah serbuk daun ungu. Daun ungu diambil dari B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Reagen mikrob yang digunakan adalah cat Gram A, Gram B, Gram C, Gram D. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Kligler Iron Agar* (KIA), *Endo Agar* (EA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Lysine Iron Agar* (LIA), Sitrat. Bakteri yang digunakan adalah *E. coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Reagen kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut etanol 96%, *n*-heksan, etil asetat, DMSO 5%, aquadest steril, Mc Farland 0,5, silika gel 254, suspensi kotrimoksazol (Ratrim), HCl, FeCl₃, pereaksi semprot sitroborat, LB, dragendroff, serbuk Mg, anhidrida asetat, larutan mayer, pelarut xylen, wagner dan kloroform.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah pembakar spiritus, kaki tiga, kasa, selang, corong kaca, botol maserasi, penangas air, timbangan analitik, labu Erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, labu takar, inkas, jarum ose, kapas steril, pinset, ayakan no.40, oven, batang pengaduk, seperangkat alat evaporator, *Sterling Bidwell*, plat KLT, detektor sinar 254 nm dan 366 nm, autoklaf, inkubator, kotak septis, beaker glass, pipet ukur, kain flannel, cawan porselin, cawan petri, corong pisah, kertas saring, kaca obyek, deck glass, dan mikroskop.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi dan identifikasi daun ungu.

Tahap pertama penelitian ini adalah determinasi dan identifikasi daun ungu. Hal ini dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian. Determinasi dan identifikasi dilakukan menurut pustaka dari laboratorium dan perpustakaan B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Penyiapan bahan

Daun ungu diambil dari B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah dalam sediaan simplisia kering. Penyerbukan daun ungu dilakukan dengan cara diserbuk menggunakan alat penyerbuk dan diayak menggunakan ayakan no. 40.

3. Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air serbuk daun ungu dilakukan menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Metode ini dilakukan dengan cara menimbang serbuk daun ungu

20 gram dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xylen sampai serbuk terendam kemudian memasang alat *Sterling Bidwell*. Panaskan labu dengan hati-hati, dipanaskan dengan api kecil setelah mendidih api dibesarkan. Pemanasan dihentikan jika pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes. Kemudian diukur kadar airnya dengan menggunakan alat *Sterling Bidwell* dengan melihat volume pada skala alat tersebut. Kadar air dihitung dalam % v/b (Kementrian Kesehatan RI 2013).

4. Pembuatan ekstrak etanol daun ungu

Serbuk daun ungu dimasukkan ke dalam bejana lalu ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1:7,5. Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojok, setelah itu dipisahkan antara filtrat dengan ampas menggunakan kain flannel. Ampas ditambah cairan penyari diaduk dan disaring, sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40°C sehingga menjadi ekstrak etanol daun ungu yang pekat.

5. Pembuatan fraksi ekstrak etanol daun ungu

Ekstrak daun ungu yang sudah ditimbang dilarutkan dengan etanol lalu ditambahkan aquadest hangat sebanyak 75 ml yang kemudian dimasukkan dalam corong pisah dengan *n*-heksan sebanyak 3 kali 75 ml. Hasil fraksinasi dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40°C kemudian hasil ditimbang dan disebut sebagai fraksi *n*-heksan.

Residu dari fraksinasi *n*-heksan dimasukkan dalam corong pisah lagi dengan penambahan etil asetat sebanyak 3 kali 75 ml. Hasil fraksinasi dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40°C kemudian hasil ditimbang dan disebut sebagai fraksi etil asetat.

Residu dari fraksi etil asetat dipekatkan menggunakan *water bath* suhu \pm 50°C kemudian hasil ditimbang dan disebut fraksi air.

6. Pengujian kandungan senyawa kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun ungu

6.1. Saponin. Sebanyak 10 ml air panas dalam tabung reaksi didinginkan kemudian ditambahkan sebanyak 0,1 gram serbuk simplisia, ekstrak dan fraksi

lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Depkes 1986).

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

6.3. Flavonoid. Sebanyak 0,1 gram serbuk, ekstrak dan fraksi teraktif dilarutkan dalam etanol panas dan ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk warna jingga (Setyowati dkk 2014).

6.4. Alkaloid. Sebanyak 0,1 gram serbuk, ekstrak dan fraksi teraktif ditambah 1 ml HCl 2N dan 9 ml aquadest kemudian panaskan \pm 2 menit, dinginkan dan disaring. Filtrat dibagi 3 bagian, tiap filtrat ditambah pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk endapan putih, terbentuk warna coklat kemerahan, terbentuk jingga (Setyowati dkk 2014).

6.5. Steroid. Sebanyak 1 mg bahan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan 0,5 ml asam asetat anhidrida. Selanjutnya campuran ditetesi dengan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Bila terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid dan bila terbentuk warna merah, hijau atau violet-biru menunjukkan adanya terpenoid (Jones & Kinghorn 2006).

7. Uji bebas etanol

Ekstrak pekat yang telah jadi dapat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat lalu dipanaskan. Uji positif bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 1978).

8. Sterilisasi alat dan bahan

Bahan atau peralatan yang digunakan dalam penelitian harus dalam kondisi yang steril. Cawan petri, pipet, tabung reaksi, dan labu disterilkan dengan udara panas (oven). Media dan alat gelas bias disterilkan dengan autoklaf. Alat penanam bakteri (ose) disterilkan dengan pembakaran, yaitu dengan membakarnya sampai membara dengan lampu spiritus. Medium disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu mencapai 121°C selama 15 menit

9. Identifikasi bakteri uji

9.1. Identifikasi bakteri uji secara makroskopis. Bakteri *E. coli* ATCC 25922 diinokulasikan pada media selektif *Endo Agar* (EA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Berdasarkan pengamatan koloni yang dihasilkan berwarna merah dengan kilat logam yang permanen. Warna koloni merah disebabkan oleh bakteri *E. coli* dan koliform memetabolisme laktosa menjadi aldehid dan asam sehingga aldehid bereaksi dengan fuchsin. Aldehid akan melepaskan fuksin dari senyawa fuksin-sulfat kemudian akan mewarnai koloni merah dan akan terlihat berwarna seperti kilatan logam (Kartika dkk 2014).

9.2. Identifikasi mikroskopis bakteri uji dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa bakteri tersebut golongan bakteri *E. coli*. Gram negatif didapatkan bila sel bakteri berwarna merah, bentuk bacilli berarti positif golongan *E. coli*. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat ulasan (smear) yang difiksasi kemudian ditetesi Kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada preparat sampai semua ulasan terwarnai, didiamkan selama kurang lebih 1 menit, kemudian dicuci dengan aquadest mengalir lalu ditetesi dengan mordant (*lugol's iodine*/ Gram B), didiamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci kembali dengan aquadest mengalir dan dikering anginkan. Preparat dilunturkan dengan Gram C (alkohol) sampai alkohol yang jatuh berwarna jernih, lalu dicuci dengan aquadest mengalir. Preparat ditetesi Gram D (safranin) dan ditunggu 45 detik kemudian dicuci dengan aquadest mengalir setelah itu preparat dikeringkan dengan kertas *tissue* yang ditempelkan di sisi ulasan lalu didiamkan sampai mengering di udara dan diamati di bawah mikroskop (Volk dan Wheller 1988).

9.3. Identifikasi bakteri uji secara biokimia. Identifikasi berdasarkan biokimia dengan menggunakan media SIM, KIA, LIA dan Sitrat.

Pertama, media SIM. Biakan murni bakteri diinokulasikan pada permukaan media dengan cara ditusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya sulfide indol, dan motilitas. Uji sulfida positif bila media berwarna hitam. Uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah reagen Ehrlich A dan B 5 tetes. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagella. Hasil positif *E. coli* ditunjukkan *Sulfide* negatif, *Indol* positif, *Motility* positif (-++) (Sri 2016).

Kedua, media KIA. Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara ditusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, asam dan gas. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, ada tidaknya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada bagian lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), sulfide positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+). Pada bagian miring, jika bakteri dapat memfermentasi laktosa dan sakarosa, warna media berubah menjadi kuning. Hasil positif *E. coli* ditunjukkan A/AGS⁻ (Sri 2016).

Ketiga, media LIA. Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara ditusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui terbentuknya sulfide dan deaminasi lisin. Selanjutnya diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media menunjukkan uji sulfide positif. Hasil positif *E. coli* ditunjukkan K/KS⁻ (Sri 2016).

Keempat, media Sitrat. Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara ditusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Bakteri yang memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon akan menghasilkan natrium karbonat yang bersifat alkali, sehingga dengan

adanya indikator brom thymol blue menyebabkan warna biru pada media. Uji ini positif bila media berwarna biru dan negatif jika media tetap berwarna hijau. Hasil positif *E. coli* ditunjukkan citra negatif (Sri 2016).

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan bakteri uji diambil dari biakan murni pada media NA, diambil dengan ose steril kurang lebih satu ose kemudian dimasukkan ke tabung reaksi yang telah berisi media *Brain Heart Infusien* (BHI) 10 mL lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 5-8 jam. Tabung reaksi yang berisi suspensi bakteri tersebut diambil dan diamati kekeruhannya lalu disesuaikan dengan kekeruhan Mc Farland 0,5 yang menunjukkan kekeruhan bakteri sama dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. (Bonang & Koewardono 1982).

11. Pengujian aktivitas antibakteri daun ungu secara difusi

Ekstrak etanol hasil maserasi dan ketiga sediaan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun ungu dibuat masing masing pada konsentrasi 50%, 25% dan 12,5% yang didapatkan diuji secara mikrobiologi terhadap bakteri *E. coli* ATCC 25922. Metode yang digunakan adalah metode difusi boorprop (sumuran). Metode difusi digunakan untuk menentukan luas zona hambat terhadap bakteri uji. Metode difusi menggunakan cawan petri steril yang telah diisi dengan media MHA sebanyak 30 mL. Larutan stok ekstrak dan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air kemudian diteteskan pada sumuran yang telah dibuat dan didiamkan pada suhu kamar selama 10-20 menit. Kemudian sebagai pembanding diletakkan pula kertas cakram kotrimoksazol dan sebagai kontrol negatif diletakkan pula kertas cakram yang telah ditetesi DMSO 5%. Replikasi dilakukan tiga kali. Masa inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya, setelah itu diukur diameter zona hambar disekitar sumuran yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar sumuran menandakan bahwa kandungan kimia daun ungu memiliki daya hambat terhadap *E. coli* ATCC 25922.

12. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif secara dilusi

Metode dilusi dengan menggunakan 1 deretan tabung reaksi yang terdiri dari 12 tabung steril. Tabung tersebut masing-masing mempunyai konsentrasi berbeda-beda ditambah kontrol positif dan kontrol negatif. Suspensi bakteri dalam medium BHI dimasukkan ke dalam masing-masing tabung uji. Seluruh tabung

diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. KHM ditentukan dengan melihat batas terendah tabung media yang jernih diinokulasikan secara goresan pada media selektif untuk masing-masing bakteri uji. Tabung media tadi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah fraksi teraktif tidak ada koloni pada media EA.

13. Identifikasi golongan senyawa pada fraksi teraktif secara Kromatografi Lapis Tipis

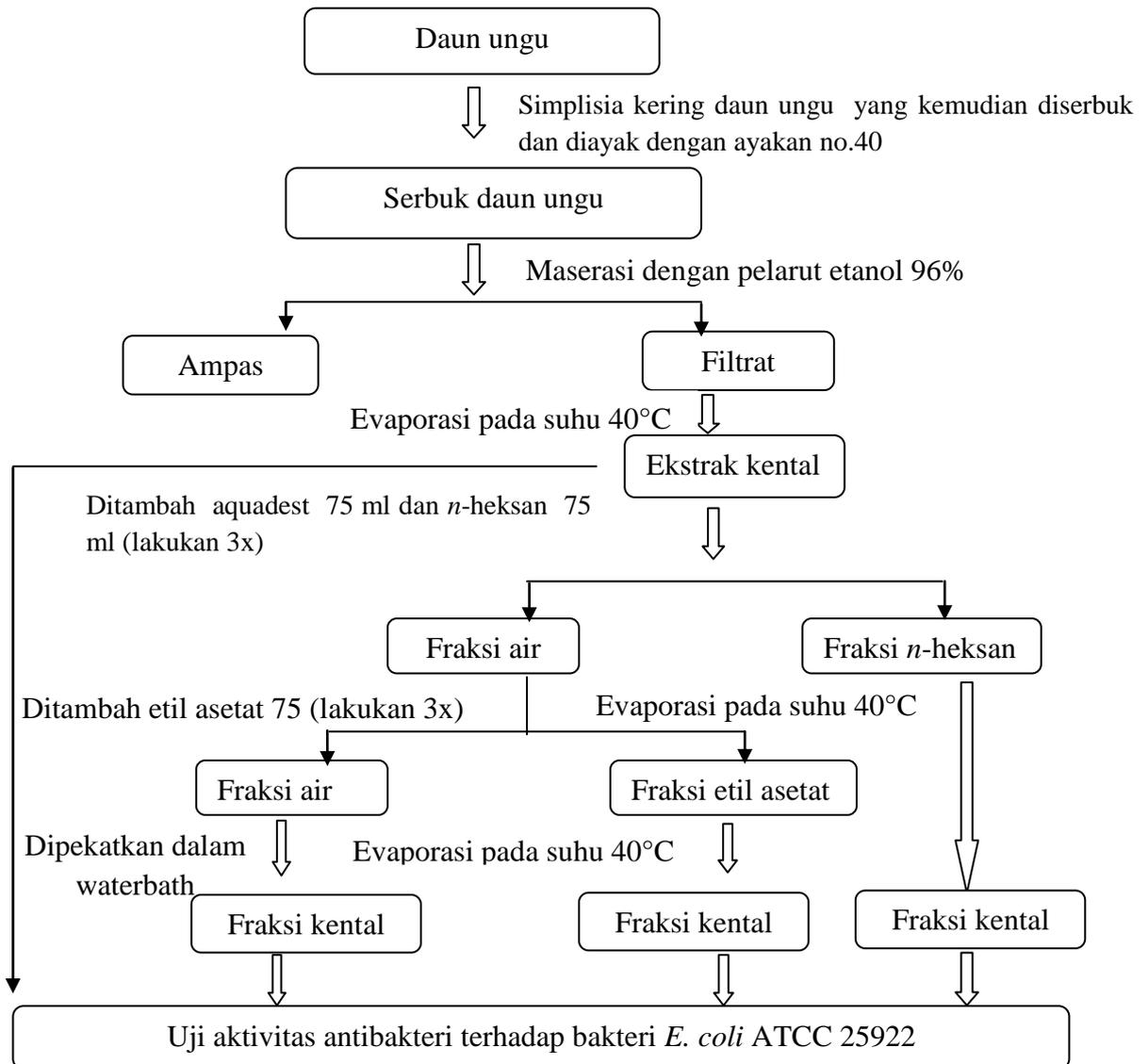
Fraksi teraktif dari ekstrak etanol daun ungu dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari sisi bawah lempeng KLT. Bak kromatografi dilapisi dengan kertas saring lalu dijenuhkan dengan fase gerak yang sesuai, ditandai dengan kertas saring terbasahi semuanya. Setelah totolan kering, lempeng KLT dimasukkan ke dalam bak kromatografi yang sudah dijenuhkan lalu dilakukan elusi sampai jarak tertentu. Lempeng KLT diangkat dan diangin-anginkan hingga kering, kemudian noda dideteksi di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dengan pereaksi tertentu. Bercak yang terdeteksi kemudian dapat ditentukan harga Rfnya dan dapat dilihat penampakan warna yang terjadi.

13.1 Identifikasi Flavonoid. Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan menggunakan KLT, fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dengan fase gerak kloroform : etanol (5:5). Pereaksi penampak sitroborat. Flavonoid akan berfluorensi pada sinar UV 366 nm. Hasil positif jika terbentuk fluoresensi kuning, biru dan ungu pada UV 366 nm (Harborne 1987).

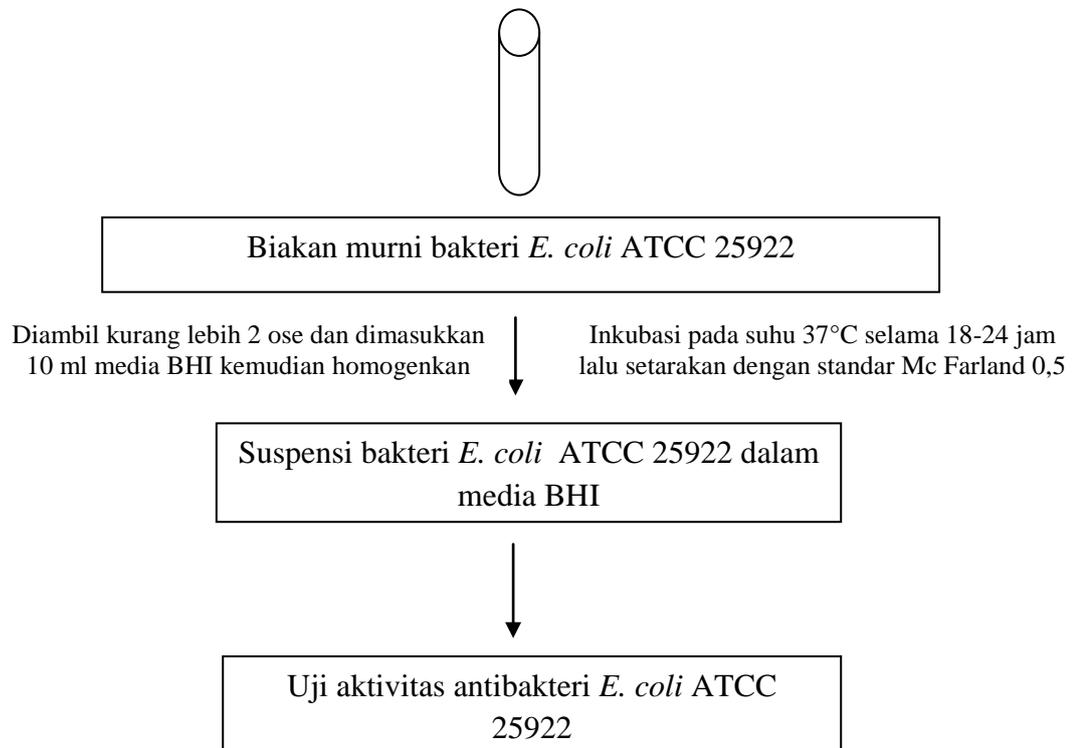
E. Analisis Data

Hasil uji aktivitas bakteri ekstrak daun ungu terhadap *E. coli* menggunakan metode difusi yang dinyatakan dengan nilai zona hambat yang terbentuk. Hasil data yang diperoleh dianalisis menggunakan statistik metode One Way Anova.

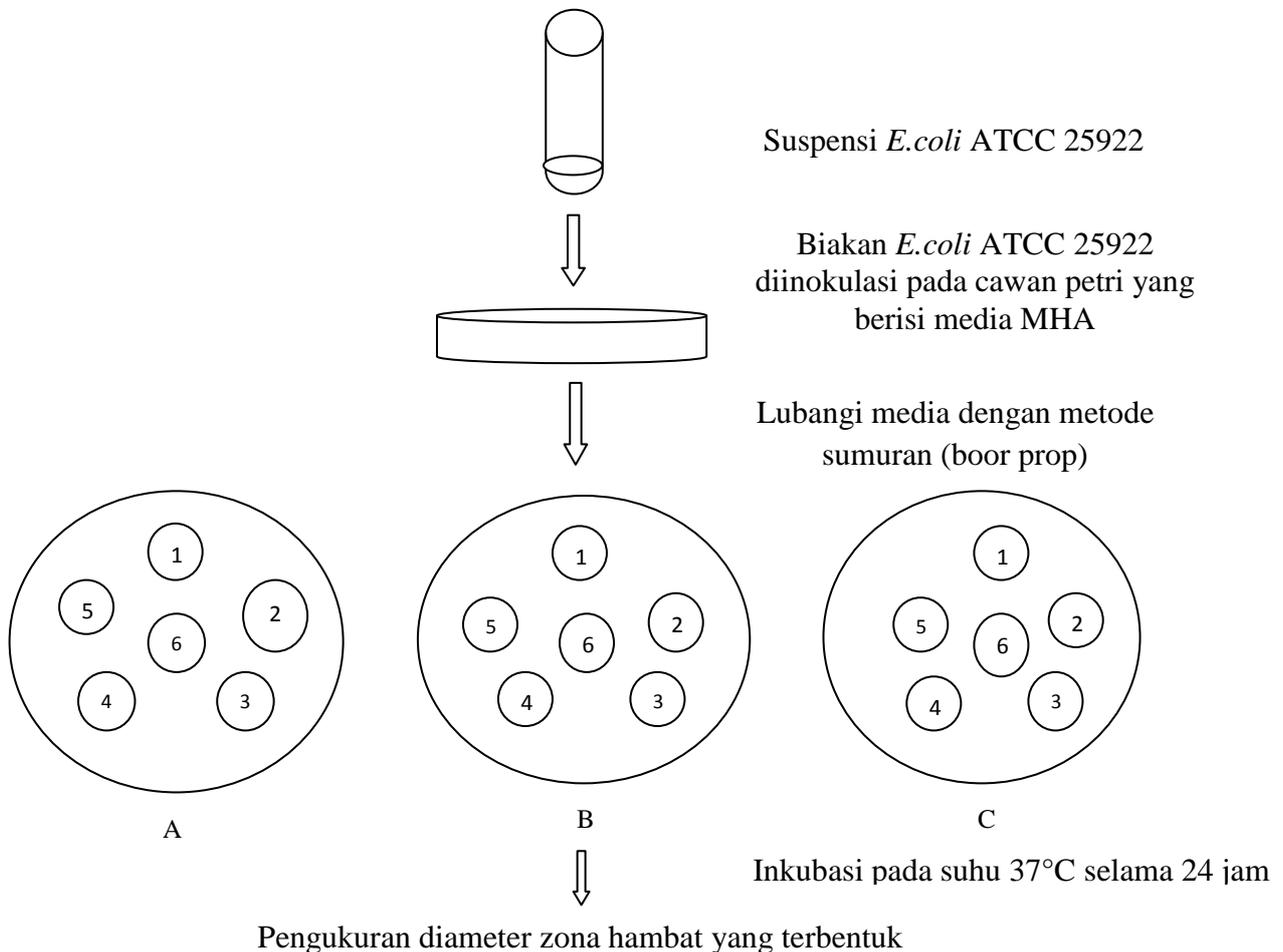
F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun ungu.



Gambar 2. Skema pembuatan suspensi bakteri.



Keterangan (A) :

- 1 : ekstrak 50%
- 2 : fraksi *n*-heksan 50%
- 3 : fraksi etil asetat 50%
- 4 : fraksi air 50%
- 5 : kontrol - (DMSO 5%)
- 6 : kontrol + (kotrimoksazol)

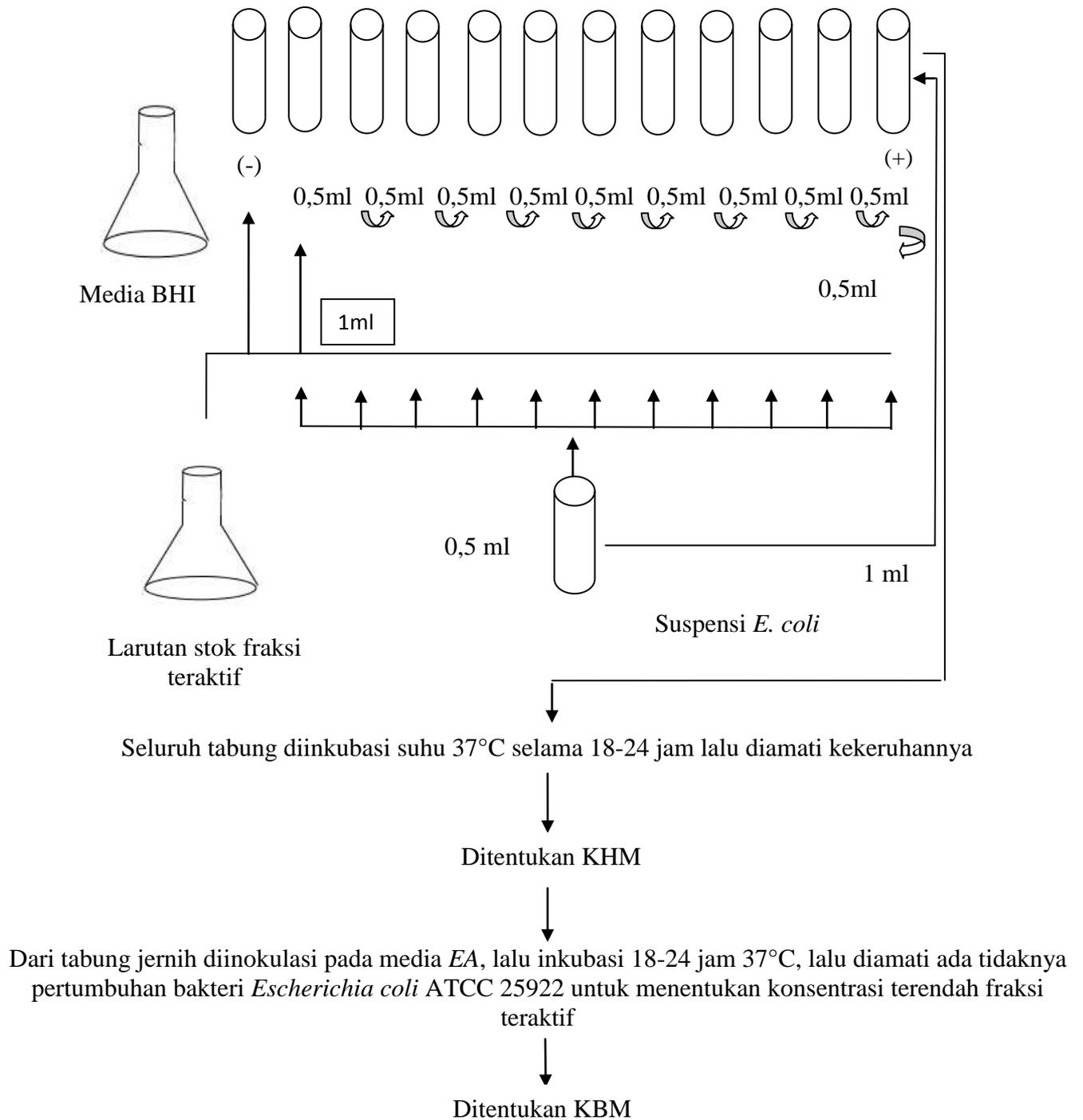
Keterangan (B) :

- 1 : ekstrak 25%
- 2 : fraksi *n*-heksan 25%
- 3 : fraksi etil asetat 25%
- 4 : fraksi air 25%
- 5 : kontrol - (DMSO 5%)
- 6 : kontrol + (kotrimoksazol)

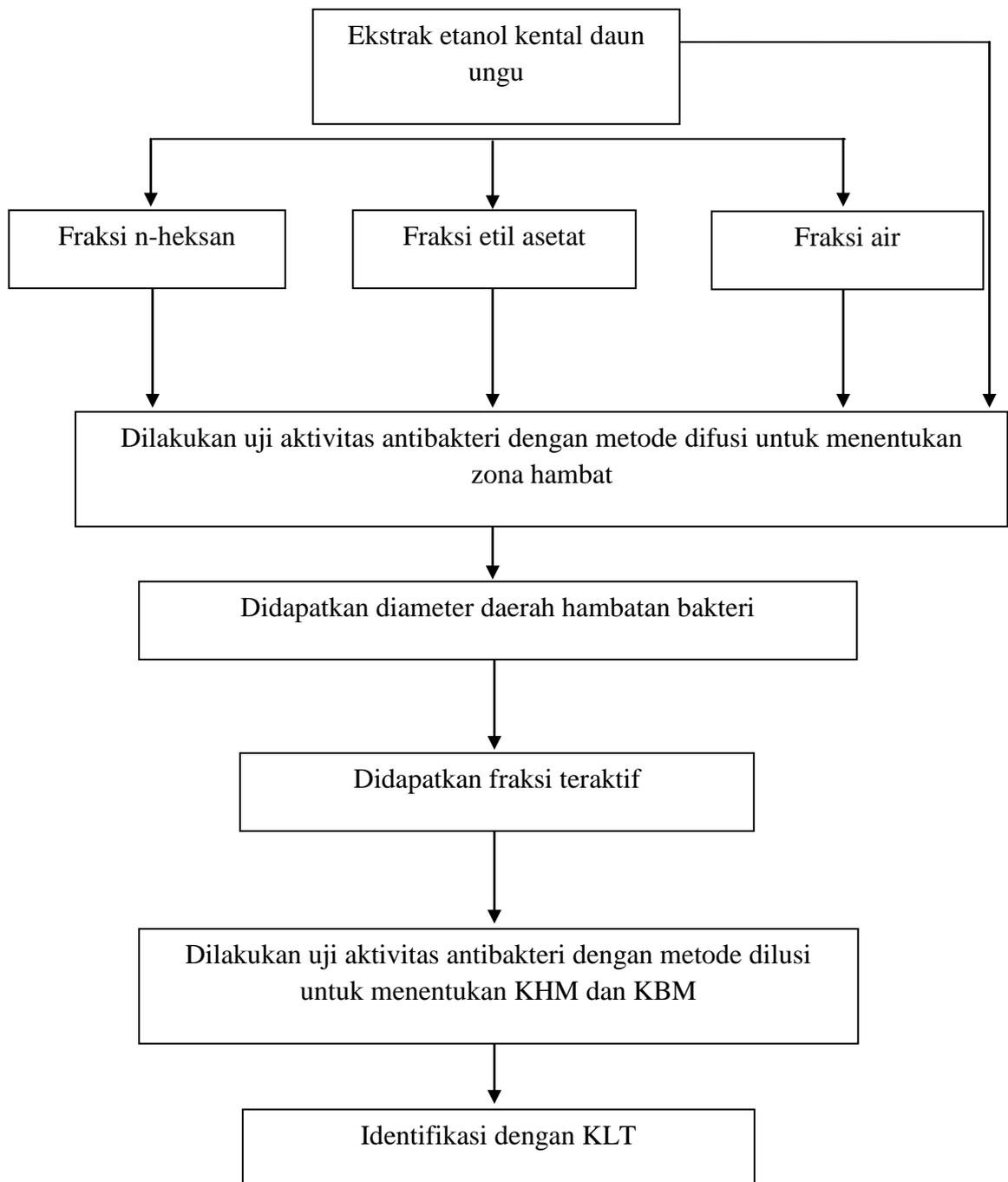
Keterangan (C) :

- 1 : ekstrak 12,5%
- 2 : fraksi *n*-heksan 12,5%
- 3 : fraksi etil asetat 12,5%
- 4 : fraksi air 12,5%
- 5 : kontrol - (DMSO 5%)
- 6 : kontrol + (kotrimoksazol)

Gambar 3. Skema kerja uji aktivitas daun ungu terhadap *E. coli* ATCC 25922 secara difusi.



Gambar 4. Skema kerja uji aktivitas fraksi teraktif ekstrak daun ungu terhadap *E. coli* ATCC 25922 secara dilusi.



Gambar 5. Skema penelitian.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi Tanaman Ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff.)

Determinasi tanaman ungu dilakukan di laboratorium B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Determinasi dimaksudkan untuk mengetahui kebenaran dari tanaman yang akan diteliti demi menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan dan kemungkinan tercampurnya bahan dengan tanaman yang lain.

Berdasarkan hasil identifikasi yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar tanaman ungu. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pembuatan serbuk daun ungu

Daun ungu yang telah dikeringkan dan dihitung bobot keringnya terhadap bobot basah daun ungu dapat dilihat pada tabel 1. Hasil perhitungan bobot kering terhadap bobot basah pengeringan daun ungu pada lampiran 7.

Tabel 2. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun ungu

Bobot Basah (gram)	Bobot Kering (gram)	Rendemen (%)
30.000	3	10

3. Penetapan kadar air serbuk daun ungu

Penetapan kadar air serbuk daun ungu dilakukan menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Penetapan kadar air dimaksudkan untuk mengetahui persentase kadar air yang terkandung dalam serbuk daun ungu yang akan diekstraksi. Persentase kadar air yang baik adalah kurang dari 10%. Kadar air yang terlalu tinggi tidak diperbolehkan karena dapat mempermudah jamur dan mikroorganisme lainnya tumbuh serta dapat menyebabkan perubahan kimiawi yang dapat merusak dan menurunkan mutu serbuk daun ungu. Hasil penetapan kadar air dapat dilihat pada tabel 2. Perhitungan penetapan kadar air dapat dilihat pada lampiran.

Tabel 3. Penetapan kadar air serbuk dari daun ungu

No	Bobot serbuk (gram)	Volume air (ml)	Kadar air (%)
1	20	1,8	9,0
2	20	1,6	8,2
3	20	1,6	8,2
Rata-rata			8,33

Hasil rata-rata persentase penetapan kadar air serbuk daun ungu adalah 8,33%, sehingga telah memenuhi syarat yang telah ditentukan yaitu kurang dari 10% (Depkes RI 1979).

4. Pembuatan ekstrak etanol daun ungu

Pelarut yang digunakan dalam esktraksi daun ungu adalah etanol 96%. Etanol adalah penyari serbaguna yang baik untuk ekstraksi (Harborne 1987). Metode yang digunakan dalam ekstraksi ini adalah maserasi. Maserasi merupakan cara ekstraksi paling sederhana. Proses maserasi dimulai dengan merendam simplisia yang sudah dihaluskan menjadi serbuk dalam larutan penyari sampai meresap dan susunan sel akan melunak sehingga zat-zat yang mudah larut akan terlarut (Depkes 2008)

Hasil rendemen ekstrak etanol daun ungu dapat dilihat pada tabel 3. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 9.

Tabel 4. Hasil pembuatan ekstrak dari daun ungu

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
500	72	14,4
1000	117,19	11,71
1000	120,30	12,03

5. Fraksinasi ekstrak etanol daun ungu

Hasil ekstraksi dari serbuk daun ungu kemudian dilakukan fraksinasi. Tujuan dilakukan fraksinasi adalah untuk memisahkan golongan senyawa dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan polaritas pelarutnya. Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi penelitian ini adalah *n*-heksan, etil asetat dan air. *n*-heksan merupakan pelarut yang bersifat non polar, etil asetat bersifat semi polar dan air bersifat polar. Hasil fraksinasi daun ungu dapat dilihat pada tabel 4. Perhitungan rendemen fraksinasi dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 5. Hasil total fraksi ekstrak dari daun ungu

Fraksi	Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%)
<i>n</i> -heksan	340,86	121,490	35,64
Etil asetat	340,86	14,191	4,163
Air	340,86	139,648	40,97

Berdasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa hasil rendemen yang didapat dari setiap pelarut berbeda-beda dimana perolehan dari fraksi air lebih besar dibanding fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan karena sifat dari kandungan senyawa dari daun ungu bersifat polar. Organoleptis fraksi *n*-heksan berwarna kehijauan, fraksi etil asetat berwarna hijau tua dan fraksi air berwarna coklat.

6. Identifikasi kandungan senyawa kimia dari serbuk, ekstrak dan fraksi teraktif daun ungu

Identifikasi kandungan senyawa kimia ini dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung di dalam daun ungu. Hasil identifikasi serbuk dapat dilihat pada tabel 5. Foto hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun ungu

Kandungan senyawa kimia	Serbuk	Ekstrak	Keterangan	
			Serbuk	Ekstrak
Saponin	Terbentuk busa stabil	Terbentuk busa stabil	+	+
Tanin	Hijau kehitaman	Hitam	+	+
Flavonoid	Jingga	Terbentuk warna jingga terang	+	+
Alkaloid	Rg.Mayer : endapan putih	Rg.Mayer : endapan putih	+	+
	Rg.Dragendorff : jingga	Rg.Dragendorff : jingga	+	+
Steroid	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	+	+

Berdasarkan tabel 5 hasil dari identifikasi kandungan senyawa secara kualitatif dari serbuk dan ekstrak etanol daun ungu menunjukkan bahwa serbuk dan ekstrak mengandung senyawa saponin, tanin, flavonoid, alkaloid dan steroid. Penelitian Arifatin (1999) juga menyatakan bahwa daun ungu mengandung senyawa saponin, steroid, tanin, flavonoid dan alkaloid. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dari fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air

Kandungan senyawa kimia	Hasil			Keterangan		
	<i>n</i> -heksan	Etil asetat	Air	<i>n</i> -heksan	Etil asetat	Air
Saponin	Tidak terbentuk busa	Tidak terbentuk busa	Busa stabil	-	-	+
Tanin	Hijau muda	Coklat kemerahan	Hijau kehitaman	-	-	+
Flavonoid	Hijau tua	Terbentuk cincin warna jingga	Hijau tua	-	+	-
Alkaloid	Rg.Mayer : ada endapan hijau	Rg.Mayer : ada endapan putih	Rg.Mayer : endapan jingga	-	+	-
	Rg.Dragendroff : endapan hijau	Rg.Dragendroff : jingga	Rg.Dragendroff : fl. Jingga	-	+	+
Steroid	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	Jingga	+	+	-

Berdasarkan tabel di atas menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksan mengandung senyawa steroid lalu pada fraksi etil asetat mengandung flavonoid, alkaloid dan steroid sedangkan fraksi air mengandung senyawa saponin, tanin dan alkaloid.

7. Uji bebas etanol dari ekstrak daun ungu

Identifikasi uji bebas etanol pada ekstrak daun ungu dimaksudkan untuk memastikan bahwa dalam ekstrak sudah tidak mengandung etanol. Hasil pengujian bebas etanol ekstrak daun ungu dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 8. Hasil pengujian bebas etanol ekstrak daun ungu

Esterifikasi	Hasil uji	Pustaka
Ekstrak + asam asetat + asam sulfat kemudian dipanaskan	Tidak berbau ester	Tidak Berbau ester (Praeparandi 1999)

Hasil uji yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak daun ungu sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 96%, hasil ditunjukkan dengan tidak adanya bau etanol pada ekstrak. Uji bebas etanol dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak daun ungu sudah bebas dari etanol, sehingga saat dilakukan pengujian antibakteri yang membunuh bakteri bukan etanol melainkan ekstrak dari daun ungu.

8. Identifikasi bakteri *E. coli* ATCC 25922

8.1. Identifikasi secara makroskopis. Identifikasi bakteri *E. coli* ATCC 25922 secara makroskopis dilakukan dengan cara menginokulasi dari biakan murni pada media EA yang kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengamatan menunjukkan koloni berwarna merah dengan kilat logam hal ini disebabkan *E. coli* ATCC 25922 memetabolisme laktosa dan menghasilkan aldehid dan asam. Aldehid akan melepaskan fuksin dari senyawa fuksin-sulfat kemudian akan mewarnai koloni merah dan akan terlihat berwarna seperti kilatan logam (Kartika dkk 2014). Identifikasi koloni pada *E. coli* ATCC 25922 berdasarkan pustaka dapat dilihat pada lampiran 12.

8.2. Identifikasi bakteri secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri uji *E. coli* ATCC 25922 tersebut termasuk golongan Gram negatif. Bakteri uji *E. coli* ATCC 25922 diperoleh hasil dengan sel bakteri berwarna merah, bentuk batang kecil. Kristal violet (Gram A) ditetaskan sehingga menyebabkan kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. Mordant (lugol iodine/Gram B) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya ikatan dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas peningkatan zat warna oleh sel bakteri, seluruh bakteri akan berwarna biru. Gram C (alkohol) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya pori-pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks kristal violet-iodine tidak menempel pada dinding sel bakteri, hal ini menyebabkan sel Gram negatif akan kehilangan warna birunya. Pewarna safranin (Gram D) ditetaskan sehingga sel Gram negatif yang awalnya kehilangan warna akan memiliki warna yang kontras yaitu merah. Identifikasi mikroskopis *E. coli* ATCC 25922 dengan pengecatan Gram dapat dilihat pada lampiran 11.

8.3. Hasil identifikasi biokimia. Uji biokimia bakteri merupakan suatu cara untuk mengidentifikasi suatu biakan murni bakteri hasil inokulasi melalui sifat-sifat fisiologisnya. Identifikasi uji biokimia pada bakteri *E. coli* ATCC 25922 menggunakan medium yang terdiri dari SIM, KIA, LIA dan sitrat. Hasil

identifikasi uji biokimia pada bakteri *E. coli* ATCC 25922 dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 9. Identifikasi uji biokimia pada *E. coli* ATCC 25922

Pengujian	Hasil	Pustaka (Sri 2016)
SIM	-++	-++
KIA	A/AG S(-)	A/AG S(-)
LIA	K/K S(-)	K/K S(-)
SITRAT	-	-

Keterangan:

- SIM : Sulfida Indol Motilitas
- KIA : Kliger Iron Agar
- LIA : Lysine Iron Agar
- A : Reaksi Asam
- K : Reaksi Basa
- G : Terbentuk gas
- S : Terbentuk Sulfida (warna hitam)

Media SIM untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pengujian SIM menunjukkan hasil sulfida negatif, artinya *E. coli* tidak dapat mereduksi thiosulfate sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida. Uji indol positif disebabkan bakteri *E. coli* membentuk indol dari tryptopan sebagai sumber karbon. Uji indol menunjukkan hasil positif setelah ditambahkan tiga tetes reagen erlich A dan B. Reagen erlich A dan B mengandung dimetilaminobenzaldehid dan akan menghasilkan cincin merah pada permukaan media karena indol akan bereaksi dengan dimetilaminobenzaldehid sehingga membentuk rosindol yang berwarna merah. Uji motilitas diperoleh hasil positif, ditunjukkan dengan adanya penyebaran pertumbuhan bakteri *E. coli* pada media SIM (Sri 2016).

Medium KIA untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Hasil yang diperoleh yaitu A/AGS(-), A/A artinya pada lereng dan dasar media berwarna kuning, hal ini menunjukkan bahwa *E. coli* mampu memfermentasi glukosa dan laktosa. Medium KIA mengandung laktosa 1% dan glukosa 0,1% dan *phenol red* (dalam suasana asam). KIA juga mengandung sodium thiosulfate yaitu suatu substrat penghasil H₂S. G artinya terdapat gas sehingga menyebabkan media terangkat, S(-) artinya uji hydrogen sulfide negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media KIA, endapan hitam ini terbentuk dari hydrogen sulfida yang akan bereaksi Fe⁺⁺.

Hidrogen sulfida terbentuk karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan methion (Sri 2016).

Medium LIA untuk mengetahui suatu reaksi kimiawi pada metabolisme yang melepaskan gugus amina dari molekul asam amino (deaminasi) dan reaksi kimia yang menyebabkan sebuah gugus karboksil terlepas dari senyawa semula menjadi karbon dioksida (dekarboksilasi) lisin dan sulfida. Pengujian dengan LIA menunjukkan hasil K/KS (-), K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) di seluruh media, S(-) artinya uji H₂S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA (Sri 2016).

Medium sitrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian sitrat menunjukkan hasil negatif. Hal ini menunjukkan bahwa *E. coli* tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal, dalam medium sitrat terdapat indikator BTB yang merupakan indikator pH, jika mikroba mampu menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium yang berwarna hijau menjadi biru (Sri 2016). Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan hasil bahwa bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *E. coli* ATCC 25922. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada lampiran 13.

Berdasarkan dari hasil pengujian identifikasi yang telah dilakukan kemudian dibandingkan dengan pustaka menunjukkan bahwa bakteri yang diamati adalah *E. coli* ATCC 25922.

9. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi dari daun ungu dengan metode difusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi yang bertujuan untuk mengetahui daerah hambat pertumbuhan dari bakteri uji. Pengujian antibakteri terhadap *E. coli* ATCC 25922 menggunakan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun ungu untuk mengetahui ekstrak atau fraksi yang paling aktif. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5%, dimana pelarut ini merupakan pelarut yang digunakan dalam

pembuatan seri konsentrasi pada ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air. Pelarut DMSO 10% merupakan pelarut organik dan tidak bersifat bakterisidal (Reynolds 1996), untuk itu DMSO 5% perlu diikuti sertakan dalam pengujian aktivitas antibakteri.

Hasil dari pengujian DMSO 5% tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga daya hambat yang terbentuk benar-benar merupakan aktivitas dari masing-masing fraksi dan ekstrak etanol dari daun ungu. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian ini adalah 50%, 25% dan 12,5% dengan menggunakan antibiotik kotrimoksazol sebagai kontrol positif dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Mekanisme antibiotik kotrimoksazol kerjanya berdasarkan pada dua tahap yang berurutan dalam reaksi enzimatik untuk membentuk asam tetrahidrofolat. Sulfametoksazol menghambat masuknya molekul PABA ke dalam molekul asam folat dan trimethoprim menghambat terjadinya reaksi reduksi dari hidrofolat menjadi tetrahidrofolat. Tetrahidrofolat penting untuk reaksi-reaksi pemindahan satu atom C, seperti pembentukan basa purin (adenine, guanine dan timidin) dan beberapa asam amino (metionin, glisin) (Ganiswara 1995).

Perhitungan pembuatan konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 14. Kekeruhan suspensi bakteri disesuaikan dengan standard *Mc Farland* 0,5. Metode difusi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode boor prop, sehingga sebelumnya larutan uji diteteskan sebanyak 50 µl ke dalam sumuran tersebut. Masa inkubasi pengujian aktivitas bakteri selama 24 jam pada suhu 37°C, daya hambat yang terbentuk berupa zona jernih disekitar daerah sumuran dinyatakan dalam ukuran mm.

Pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, air dan ekstrak etanol daun ungu menunjukkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* ATCC 25922. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya zona jernih yang mengelilingi daerah sumuran. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dapat dilihat pada tabel 10. Foto hasil metode difusi dapat dilihat pada lampiran 18.

Tabel 10. Hasil uji aktivitas antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi

Sediaan Uji	Konsentrasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata (mm) ± SD	Ket
		Replikasi				
		1	2	3		
Ekstrak	50%	20	19	19	19,3 ± 0,57	S
	25%	15	14	15	14,6 ± 0,57	I
	12,5%	13	12	11	12,0 ± 1,00	R
Fraksi <i>n</i> -heksan	50%	14	15	15	14,6 ± 0,57	I
	25%	13	12	13	12,6 ± 0,57	R
	12,5%	10	10	11	10,3 ± 0,57	R
Fraksi etil asetat	50%	23	24	23	23,3 ± 0,57	S
	25%	20	21	20	20,3 ± 0,57	S
	12,5%	17	16	17	16,6 ± 0,57	I
Fraksi air	50%	18	18	17	17,6 ± 0,57	I
	25%	15	15	14	14,6 ± 0,57	I
	12,5%	11	11	12	11,3 ± 0,57	R
Kotrimoksazol	25 µg	29	28	29	28,6 ± 0,57	S
DMSO	5%	0	0	0	0 ± 0,00	R
<i>n</i> -heksan	-	0	0	0	0 ± 0,00	R

Keterangan menurut (Faisal dkk 2015) :

S : Sensitif (Luas hambatan lebih dari 18 mm)

I : Intermediet (Luas hambatan 14-17 mm)

R : Resisten (Luas hambatan 0-13 mm)

Analisa data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi diuji secara statistik Analisis of Varian (ANOVA) *one way*. ANOVA *one way* digunakan untuk membandingkan fraksi pada tiap konsentrasi. Data yang dianalisis dengan ANOVA *one way* adalah ekstrak dan fraksi dari daun ungu. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak etanol dari daun ungu untuk mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan. Hasil statistik dapat dilihat pada lampiran 22.

Dari hasil tersebut menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi daun ungu yang mana dibuktikan adanya diameter hambat di sekitar sumuran. Fraksi daun ungu telah dibuktikan adanya diameter hambat di sekitar sumuran. Fraksi etil aetat memiliki daya hambat paling besar dibandingkan dengan daya hambat dari fraksi *n*-heksan, fraksi air dan ekstrak. Ekstrak etanol mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun ungu, akan tetapi senyawa-senyawa tersebut ternyata tidak mampu bekerja secara sinergis sehingga daya hambat yang terbentuk lebih kecil dari fraksi teraktif yang mempunyai

aktivitas antibakteri yaitu fraksi etil asetat dari daun ungu. Fraksi air memiliki aktivitas penghambatan lebih besar dari fraksi *n*-heksan. Fraksi *n*-heksan memiliki aktivitas penghambat paling rendah dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan fraksi air. Hal ini berkaitan dengan sifat polaritas pelarut yang menarik senyawa aktif dari daun ungu yang bekerja sebagai antibakteri yaitu flavonoid yang tertarik di etil asetat. Pelarut *n*-heksan dan air tidak mengandung senyawa aktif flavonoid sehingga menyebabkan aktivitas antibakteri yang terbentuk dari fraksi *n*-heksan dan air lebih rendah dibandingkan dari fraksi etil asetat.

Fraksi etil asetat memiliki daya hambat paling besar terhadap *E. coli* ATCC 25922, hal ini dikarenakan etil asetat mampu menarik senyawa yang paling aktif sebagai antibakteri dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi yang lain. Senyawa aktif dari daun ungu lebih banyak tertarik ke etil asetat seperti senyawa flavonoid, alkaloid dan steroid yang sudah dibuktikan pada uji kandungan kimia dari ekstrak dan fraksi dari daun ungu. Mekanisme kerja dari alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Ajizah 2004). Flavonoid mempunyai mekanisme kerja mendenaturasikan protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Juliantina 2008) dan steroid mempunyai mekanisme kerja dengan merusak membrane plasma sel mikroba, sehingga menyebabkan bocornya sitoplasma keluar sel yang selanjutnya menyebabkan kematian sel (Putra 2007).

10. Pengujian Aktivitas Antibakteri secara Dilusi

Sediaan uji yang digunakan dalam metode ini adalah fraksi teraktif dari daun ungu dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang diperoleh dari metode difusi. Metode dilusi berguna untuk mencari KHM dan KBM menggunakan sediaan fraksi teraktif yaitu fraksi etil asetat dari daun ungu. Seri konsentrasi yang digunakan yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,563%, 0,781%, 0,391%, 0,196%, 0,098%, kontrol (+) dan kontrol (-).

Pembanding antibiotik kotrimoksazol dipilih karena berdasarkan atas kerjanya pada dua tahap yang berurutan dalam reaksi enzimatik untuk membentuk

asam tetrahidrofolat. Sulfametoksazol menghambat masuknya molekul PABA ke dalam molekul asam folat dan trimethoprim menghambat terjadinya reaksi reduksi dan hidrofolat menjadi tetrahidrofolat. Tetrahidrofolat penting untuk reaksi-reaksi pemindahan satu atom C, seperti pembentukan basa purin (adenine, guanine, dan timidi) dan beberapa asam amino (metionin, glisin) Kombinasi ini mungkin efektif walaupun mikroba telah resisten terhadap trimethoprim. Frekuensi terjadinya resistensi terhadap kotrimoksazol lebih rendah dari masing-masing obat, karena mikroba yang resisten terhadap salah satu komponen lebih peka terhadap komponen yang lainnya. Sinergisme maksimum akan terjadi bila mikroba peka terhadap komponen (Ganiswara 1995).

Aktivitas antibakteri dapat diketahui dari kekeruhan masing-masing tabung uji yang kemudian digoreskan dalam media EA. KHM dapat ditentukan dari kadar terendah larutan uji yang terlihat jernih, akan tetapi hal ini sulit diamati karena warna dari larutan uji sendiri sudah keruh. Karena hal tersebut maka KHM tidak dapat ditentukan sehingga untuk menentukan KBM masing-masing tabung larutan uji dilakukan penggoresan pada media EA dan MHA, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi dapat dilihat pada tabel 10 dan lampiran 16. Foto hasil uji dilusi fraksi etil asetat dapat dilihat pada lampiran 19 dan uji dilusi kotrimoksazol pada lampiran 20.

Tabel 11. Hasil uji dilusi dari fraksi etil asetat dan antibiotik kotrimoksazol

No	Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat Replikasi			Konsentrasi (%)	Kotrimoksazol Replikasi		
		I	II	III		I	II	III
1	25	-	-	-	4,8	-	-	-
2	12,5	-	-	-	2,4	-	-	-
3	6,25	-	-	-	1,2	-	-	-
4	3,125	-	-	-	0,6	-	-	-
5	1,56	+	+	+	0,3	-	-	-
6	0,78	+	+	+	0,15	+	+	+
7	0,39	+	+	+	0,075	+	+	+
8	0,19	+	+	+	0,0375	+	+	+
9	0,09	+	+	+	0,01875	+	+	+
10	0,04	+	+	+	0,00937	+	+	+
11	K (+)	+	+	+	K (+)	+	+	+
12	K (-)	-	-	-	K (-)	-	-	-

Keterangan:

(+) = terdapat pertumbuhan bakteri *E. coli* ATCC 25922

(-) = tidak terdapat pertumbuhan bakteri *E. coli* ATCC 25922

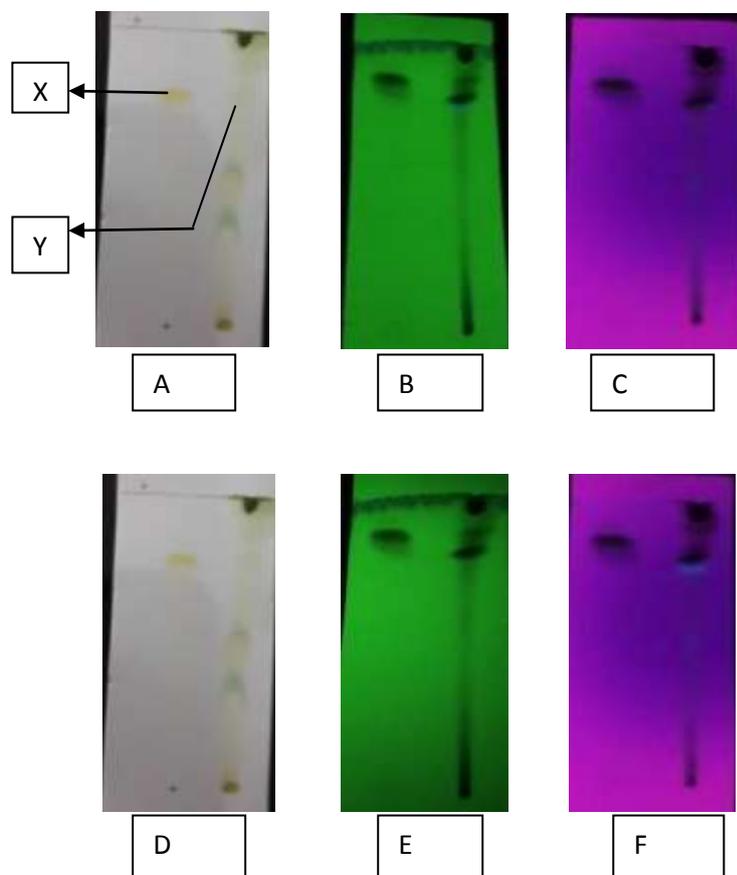
Hasil dari pengujian aktivitas antibakteri yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa fraksi etil asetat mampu membunuh *E. coli* ATCC 25922 pada konsentrasi 12,5%, sedangkan antibiotik kotrimoksazol mampu membunuh bakteri *E. coli* ATCC 25922 pada konsentrasi 0,30%. Sediaan uji yang memiliki KBM pada konsentrasi kecil menandakan bahwa semakin potensialnya sediaan tersebut sebagai antibakteri karena dengan konsentrasi kecil sediaan uji sudah dapat membunuh bakteri. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa fraksi etil asetat dari daun ungu belum mampu mengalahkan obat sintetik yaitu antibiotik kotrimoksazol karena efek yang diberikan bahan alam dari daun ungu belum memberikan hasil yang lebih optimal dalam membunuh bakteri jika dibandingkan dengan obat berbahan sintetik yaitu antibiotik kotrimoksazol.

11. Identifikasi Fraksi Teraktif dengan KLT

Analisa fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* ATCC 25922 dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui senyawa flavonoid yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun ungu. Sebelum dilakukan identifikasi senyawa menggunakan KLT terlebih dahulu dilakukan identifikasi secara kualitatif. Hasil dari identifikasi kualitatif menunjukkan bahwa etil asetat memberikan hasil positif terhadap flavonoid, Hasil identifikasi flavonoid fraksi etil asetat dengan KLT dapat dilihat pada gambar 1.

Tabel 12. Hasil identifikasi senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat menggunakan KLT

Sampel cuplikan	Rf	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	Pereaksi Sitroborat	Pustaka (Harborne 1987)	Keterangan
Quercetin	0,80	Meredam	Meredam	Warna kuning kecoklatan		+
Fraksi etil asetat	0,78	Meredam	Meredam	Warna kuning kecoklatan	Warna biru	+



Gambar 6. Profil kromatogram senyawa flavonoid, a) sinar tampak; b) UV 254 sebelum disemprot; c) UV 366 sebelum disemprot; d) sesudah disemprot sitroborat; e) UV 254 sesudah disemprot; f) UV 366 sesudah disemprot; g) x adalah quersetin; h) y adalah sampel

Hasil dari identifikasi senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat menggunakan KLT dibawah sinar tampak menunjukkan adanya warna kuning kecoklatan yang samar, pengamatan pada UV_{254} dan UV_{366} sebelum dilakukan penyemprotan menunjukkan adanya peredaman. Lempeng KLT kemudian disemprot menggunakan penyemprot sitroborat dan menunjukkan adanya bercak berwarna kuning kecoklatan yang lebih jelas dibanding sebelum disemprot. Pada UV_{254} bercak tetap menunjukkan hasil warna meredam dan pada UV_{366} menunjukkan bercak berwarna kuning. Silika gel GF254 digunakan sebagai fase diam dan fase gerak etil asetat : *n*-heksan (1 : 3) ditambah asam formiat dengan pembanding quersetin. Bercak yang tampak berwarna kuning sesuai dengan pembanding dengan nilai R_f 0,78. Hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid

dari fraksi etil asetat dengan KLT menunjukkan hasil yang sama dengan pustaka (Harborne 1987) sehingga sampel yang digunakan dinyatakan positif mengandung senyawa flavonoid.

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

Quersetin memiliki aktivitas antibakteri yang baik karena adanya gugus fenol dengan mekanisme kerja mengkoagulasi protein dengan menonaktifkan enzim-enzim dan mengganggu dinding sel sehingga memiliki sifat bakterisida yang baik (Katzung 2004).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun ungu (*Graptopyllum pictum* (L.) Griff.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, fraksi etil asetat memiliki KHM sebesar 23,3 mm dan KBM sebesar 12,5% terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melakukan isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat daun ungu (*Graptopyllum pictum* (L.) Griff.).

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melakukan uji aktivitas antibakteri dari daun ungu (*Graptopyllum pictum* (L.) Griff.) yang dikombinasikan dengan tanaman lain terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah, A., 2004, Sensitivitas Salmonella Typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L. *Bioscientiae*, Vol.1, No. 1 : 31-8.
- Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* (L) Griff) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*; Nimas Fahdiyatur Riza, 072010101025; 2010: 66 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Anief M. 2003. *Ilmu Meracik Obat, Teori dan Praktek*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Hlm 168-169.
- Ansel HC. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi IV. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Arifatin, LR. 1999. Kajian Flavonoid Daun *Graptophyllum pictum* Griff (Daun Wungu) Sebagai Analgesik dan Antiinflamasi Pada Tikus (*Rattus rattus* strain Wistar). [Skripsi]. Jurusan Biologi FMIPA Unibra.
- Balitbang Kemenkes RI. 2013. Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI.
- Basset J, Denney RC, Jeffrey GH, Mendhom J. 1994. *Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Billy S, Dkk. 2015. Pengaruh Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* linn) Dan Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camilia sinensis*) Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* In Vitro Dan Perbandingannya Dengan Kotrimoksazol. *Jurnal Poltekes Palembang*.
- Bonang, Koeswardono ES. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Unika Atmajaya. PT Gramedia.
- Cheeke PR. 2000. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Proceedings of the American Society of Animal Science, American Society of Animal Science* 1-10.
- Dalimartha S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 1*. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- [Depkes Kesehatan RI]. 1979. *Farmakope Indonesia*. Jilid 3. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- [Depkes Kesehatan RI]. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes Kesehatan RI]. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes Kesehatan RI]. 1987. *Analisis Obat Tradisional*. Jilid 1. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes Kesehatan RI]. 2008. *Pengelolaan Pasca Panen Tanaman Obat*. Balai Penelitian Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 3-12.
- Dewi RC. 2009. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Buah Pare Belut (*Trichosanthes anguina* L.) [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret.
- Djamil R, Lissa D. 2010. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Dalam Fase *n*-Butanol Dari Ekstrak Metanol Daun Daruju. Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.
- Faisal M, Fatmawali, Wewengkang DS. 2015. Uji Kepekaan Bakteri Yang Diisolasi Dan Diidentifikasi Dari Sputum Penderita Bronkhitis Di RSUP PROF. DR. R. D. Kandou Manado Terhadap Antibiotik Golongan Sefalosporin Dan Tetrasiklin. Manado. FMIPA UNSRAT Manado. ISSN 2302-2493
- Ganiswara GS. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: Gaya Baru.
- Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam*. Jilid I. Jakarta: Penebar Swadaya. Hlm 9-13.
- Handa SS, Suman PSK, Gennaro L, Dev DR. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: ICS-UNIDO.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun dan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Kosasis P, Iwang S. Penerjemah; Sofia N, editor. Bandung: ITB. Terjemahan dari: Phytochemical Methods.
- Harborne JB. 2006. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro, penerjemah;. Bandung: Penerbit ITB.
- Hariana A. 2007. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya Seri 2*. Jakarta: Penerbit Penebar Swadaya.

- Harti S. 2016. *Mikrobiologi Kesehatan*. Yogyakarta. Penerbit: Andi. Hal: 186-193.
- Haryani A. 2012. Uji Efektifitas Daun Pepaya (*Carica papaya*) untuk pengobatan Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas Koki (*Carassius auratus*). [Skripsi]. Program Program Studi Sarjana Perikanan. Universitas Padjadjaran.
- Heinrich M, Joanne B, Simon G, Elizabeth MW. 2005. *Farmakoterapi dan Fitoterapi*. Syarief ER, Cucu A, Ella E, Euis RF, penerjemah; Hadinata AH, editor. Penerbit Buku Kedokteran: EGC.
- Hermawan A. 2007. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Disk. *Article ilmiah*, Universitas Airlangga.
- Hutapea JR. 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia III*. Jakarta: Depkes RI Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Isnawati A, Iwang S. 2003. Pemeriksaan Senyawa-senyawa Turunan Fenol Daun Hendeleum (*Graptophyllum pictum* (L) Griff), Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, ITB.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Edisi XVI. Dokter Bonang H, penerjemah; Jakarta: Fakultas Kedokteran Unika Atmajaya.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi I*. Jakarta: Salemba Medika.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2007. *Medical Mikrobiology 2thEd*. The McGraw Hill Companies, USA.
- Jones WP, Kinghorn AD. 2006. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI, eds. *Natural Products Isolation. 2nd Ed*. New Jersey: Humana Press.
- Juliantina FR, 2008. Manfaat Sirih Merah (*Piper Crocatum*) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *JKKI-Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*.
- Kartika E, Khotimah S, Yanti AH. 2014. Deteksi Bakteri Indikator Keamanan Pangan Pada Sosis Daging Ayam Di Pasar Flamboyan Pontianak. *Jurnal Protobiont*. Pontianak: Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura.
- Kusmayati, Agustini NWR. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga (*Porphyridium cruentinum*). *Biodiversitas* 8:48-53.

- Lenny S. 2006. Senyawa Flavanoida, Fenilpropanida dan Alkaloida. Karya Ilmiah Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Madduluri S, Rao BK, Taram SB. 2013. In Vitro Evaluation of Antibacterial Activity of Five Indigenous Plants Extract Againsts Five Bacterial Pathogens of Human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceuticals Science*.
- Pratiwi ST. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Penerbit Airlangga.
- Putra INK. 2007. Study Daya Antimikroba Ekstrak Beberapa Bahan Tumbuhan Pengawet Nira Terhadap Mikroba Perusak Nira serta Kandungan Senyawa Aktifnya. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang.
- Radji M. 2010. *Mikrobiologi*. Jakarta: Buku Kedokteran ECG.
- Raihana, Nadia. 2011. Profil Kultur Dan Uji Sensitivitas Bakteri Aerob Dari Infeksi Luka Operasi Laparatomi Di Bangsal Bedah RSUP DR. M. Djamil Padang.[Artikel]. Padang: Universitas Andalas.
- Reynolds JEF. 1996. Martindale, The Extra Pharmacopeia 31th Edition. The Royal Pharmaceutical Society Press. London. P : 114-117.
- Rijayanti RP. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mangga Bacang (*Mangifera foetida* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro [Skripsi]. Pontianak: Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Kosasih Padwawinata, penerjemah, Bandung, Institut Teknologi Bandung.
- Rostinawati T. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Terhadap *Escherichia Coli*, *Salmonella Typhi* Dan *Staphylococcus Aureus* Dengan Metode Difusi Agar. Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran.
- Saptiani G, Prayitno SB, Anggoro S. 2013. Potensi Antibakteri Daun Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) Terhadap *Vibrio harveyi* Secara In Vitro. *Jurnal Kedokteran Hewan*. ISSN : 1978-225X
- Sari SA. 2010. Efek Antifungi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) Terhadap Pertumbuhan *Trichophyton rubrum in vitro* [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret.
- Sarker SD, Zahid L, Alexander IG. 2005. *Natural Products Isolation Second Edition*. Humana Press.
- Setyowati WA, Sri RDA, Ashadi, Mulyani B, Cici PR. 2014. Skrining Fitokimia Dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Kayu Durian (

Durio zibethinus Murr.) Varietas Petruk. *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan VI*. ISBN : 9779373174-0 : 271-280.

Stahl E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Kosasih Padmawinata, Sodin, penerjemah; Bandung: Penerbit ITB.

Suriawiria U. 1986. *Mikrobiologi Air Dasar-dasar Pengolahan Buangan Secara Biologi*. Cetakan 1. Bandung: Penerbit Alumni.

Suryono DRB. 1995. *Bakteriologi Umum dan Bakteriologi Klinik*. Kediri: AAK Bhakti Wiyata.

Tiwari P, Bimlesh K, Mandeep K, Gurpreet K, Harleen K. 2011. Skrining Fitokimia dan Ekstraksi. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 7:98-106.

Todar K. 2008. *Staphylococcus aureus and Staphylococcal Disease* . USA : Wisconsin, Madison. Available from : <http://www.bacteriology.net/staph.html>

Voight R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Noerono S, penerjemah; Gadjah Mada University Press. Indonesia

Volk, Wheeler. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi Kelima. Jilid I. Jakarta: Penerbit Erlangga.

Waluyo L. 2005. *Mikrobiologi Umum*. Universitas Muhammadiyah Malang.

Widyarto A. 2009. Uji Aktifitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Keprok (*Citrus nobilis lour.*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* [Skripsi]. Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.

L

A

M

P

I

R

A

N

Lampiran 1. Hasil determinasi daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff.).

DETERMINASI

Species : *Graptophyllum pictum* (L.) Griff
 Familia : Acanthaceae

Kunci determinasi (Backer dan van Den Brink, 1965):

1a_2b_7b_32b_33a _____ 43. *Graptophyllum*
 1 _____ *Graptophyllum pictum* (L.) Griff.

Pertelaan:

Perawakan semak atau perdu, tegak, tinggi mencapai 3 meter. Batang berkayu, cabang bersudut tumpul, berbentuk galah dengan berbuku-buku nyata. Daun tunggal, letak bersilang dan berhadapan, bentuk helaian bulat memanjang atau lanset, pangkal segitiga terbalik (pasak), ujung meruncing, tepi bergelombang, panjang helaian daun 8-20 cm, lebar 3-13 cm, warna daun ungu kehijauan, ungu bercak hijau, ungu bercak putih, atau hijau, panjang tangkai daun ½-1 cm. Bunga majemuk bentuk malai, letak di ujung cabang, panjang tangkai bunga ½-¾ cm, kelopak berbagi 5, panjang 3 mm, segmen sempit, tabung mahkota melebar di bagian ujung, panjang 2-3 cm, segmen 5, warna merah tua.

Luwatmangu, November 2016
 Penanggungjawab Determinasi,

 Dyah Subositi, M.Sc
 NIP. 198308152006042003

Lampiran 2. Tanaman dan serbuk daun ungu (*Graphitophyllum pictum* (L.) Griff.).



Lampiran 3. *Sterling-bidwell*, Inkubator dan Evaporator



Sterling-bidwell



Evaporator



Inkubator

Lampiran 4. Maserasi dan hasil fraksi *n*-heksan dan etil asetat.



Maserasi



Fraksi *n*-heksan



Fraksi etil asetat

Lampiran 5. Foto ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air



Ekstrak



Fraksi *n*-heksan



Fraksi etil asetat



Fraksi air

Lampiran 6. Foto hasil uji kandungan senyawa serbuk, ekstrak dan fraksi aetil asetat, *n*-heksan dan air

Foto hasil uji kandungan senyawa serbuk



Saponin



Tanin



Flavonoid



Steroid



Alkaloid (D)



Alkaloid (M)

Lampiran 7. Foto hasil uji kandungan senyawa ekstrak

Saponin



Tanin



Flavonoid



Steroid



Alkaloid (D)



Alkaloid (M)

Lampiran 8. Foto hasil uji kandungan senyawa fraksi *n*-heksan

Saponin



Tanin



Flavonoid



Steroid



Alkaloid (D)



Alkaloid (M)

Lampiran 9. Foto hasil uji kandungan senyawa fraksi etil asetat

Saponin



Tanin



Flavonoid



Steroid



Alkaloid (D)



Alkaloid (M)

Lampiran 10. Foto hasil uji kandungan senyawa fraksi air

Saponin



Tanin



Flavonoid



Steroid



Alkaloid (D)



Alkaloid (M)

Lampiran 11. Hasil presentase penetapan kadar air daun ungu

No	Bobot serbuk (gram)	Volume air (ml)	Kadar air (%)
1	20	1,8	9,0
2	20	1,6	8,2
3	20	1,6	8,2
Rata-rata			8,33

Perhitungan prosentase penetapan kadar air = $\frac{\text{volume air (ml)}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$

$$\text{Kadar air I} = \frac{1,8}{20} \times 100\%$$

$$= 9,0\%$$

$$\text{Kadar air II} = \frac{1,6}{20} \times 100\%$$

$$= 8,2\%$$

$$\text{Kadar air III} = \frac{1,6}{20} \times 100\%$$

$$= 8,2\%$$

$$\text{Rata-rata prosentase kadar air} = \frac{9,0\% + 8,2\% + 8,2\%}{3} = 8,33\%$$

Lampiran 12. Rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun ungu

Bobot Basah (gram)	Bobot Kering (gram)	Rendemen (%)
30.000	3000	10

Lampiran 13. Rendemen ekstrak etanol daun ungu

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
500	72	14,4
1000	117,19	11,71
1000	120,30	12,03

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

$$= \frac{72}{500} \times 100\% = 14,4\%$$

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

$$= \frac{117,19}{1000} \times 100\% = 11,71\%$$

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

$$= \frac{120,3}{1000} \times 100\% = 12,03\%$$

Lampiran 14. Hasil perhitungan rendemen total fraksinasi

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

1. Fraksi *n*-heksan

$$\begin{aligned} \bullet \text{ \% Rendemen fraksi} &= \frac{121,490}{340,86} \times 100 \% \\ &= 35,64 \% \end{aligned}$$

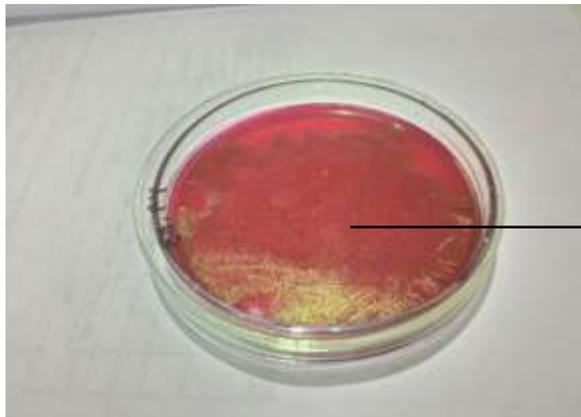
2. Fraksi etil asetat

$$\begin{aligned} \bullet \text{ \% Rendemen fraksi} &= \frac{14,191}{340,86} \times 100 \% \\ &= 4,163\% \end{aligned}$$

3. Fraksi air

$$\begin{aligned} \bullet \text{ \% Rendemen fraksi} &= \frac{139,648}{340,86} \times 100 \% \\ &= 40,97 \% \end{aligned}$$

Lampiran 15. Hasil identifikasi bakteri *E. coli* ATCC 25922 makroskopis



Koloni *E. coli*
berwarna kilat
logam

Lampiran 16. Hasil identifikasi bakteri *E. coli* ATCC 25922 mikroskopis



Bentuk batang
dan berwarna
merah

Lampiran 17. Identifikasi biokimia pada *E. coli* ATCC 25922



KIA

LIA

SITRAT

SIM

Lampiran 18. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air metode difusi

1. Konsentrasi 50%

Menimbang 1 g ekstrak dilarutkan dengan DMSO 5% sampai 2 ml

2. Konsentrasi 25%

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

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

$$V_1 \cdot 50\% = 25\%$$

$$V_1 = \frac{25\%}{50\%}$$

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

Dipipet 0,5 ml dari sediaan awal (50%) kemudian ditambah DMSO 5% sampai 1 ml.

3. Konsentrasi 12,5 %

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

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

$$V_1 \cdot 25\% = 12,5\%$$

$$V_1 = \frac{12,5\%}{25\%}$$

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

Dipipet 0,5 ml dari sediaan (25%) kemudian ditambah DMSO 5% sampai 1 ml.

Lampiran 19. Pembuatan konsentrasi fraksi etil asetat metode dilusi

Fraksi etil asetat daun ungu

Menimbang 3 gram fraksi etil asetat dalam vial larutkan dengan 6 ml DMSO 5%.

Perhitungan seri konsentrasi fraksi etil asetat menggunakan metode dilusi						
No	Konsentrasi (%)	V1	N1	V2	N2	Keterangan
1	50	-	-	-	-	1 ml larutan stok
2	50	-	-	-	-	1 ml larutan stok
3	25	0,5	50	1	25	0,5 ml tab. 2 + BHI ad 1 ml
4	12,5	0,5	25	1	12,5	0,5 ml tab. 3 + BHI ad 1 ml
5	6,25	0,5	12,5	1	6,25	0,5 ml tab. 4 + BHI ad 1 ml
6	3,125	0,5	6,25	1	3,125	0,5 ml tab. 5 + BHI ad 1 ml
7	1,56	0,5	3,125	1	1,56	0,5 ml tab. 6 + BHI ad 1 ml
8	0,78	0,5	1,56	1	0,78	0,5 ml tab. 7 + BHI ad 1 ml
9	0,39	0,5	0,78	1	0,39	0,5 ml tab. 8 + BHI ad 1 ml
10	0,19	0,5	0,39	1	0,19	0,5 ml tab. 9 + BHI ad 1 ml
11	0,09	0,5	0,19	1	0,09	0,5 ml tab. 10 + BHI ad 1 ml
12	-	-	-	-	-	1 ml suspensi bakteri

Keterangan :

Tabung 1 = kontrol negatif

Tabung 3 = konsentrasi 25%

$V1 \cdot N1 = V2 \cdot N2$

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

$V1 = 0,5 \text{ ml}$

Tabung 11 diperoleh dari 0,5 ml tabung 10 ditambah BHI 0,5 ml kemudian di homogenkan dan dibuang 0,5 ml.

Tabung 12 = kontrol positif suspensi bakteri 1 ml

Tabung 2 - 11 ditambah 0,5 ml suspensi bakteri

Lampiran 20. Pembuatan seri konsentrasi antibiotik kotrimoksazol menggunakan dilusi

Perhitungan seri konsentrasi kotrimoksazol pada uji dilusi adalah sebagai berikut :
Kotrimoksazol terdiri dari 200 mg sulfametoksazol dan 40 mg trimetrophim / 5 ml. Dalam 5 ml terdapat kombinasi sulfametoksazol dan trimetrophim sebesar 4% b/v dan 0,8% b/v dalam suspensi kotrimoksazol.

No	Konsentrasi (%)	V1	N1	V2	N2	Keterangan
1	4,8	-	-	-	-	1 ml larutan stok
2	4,8	-	-	-	-	1 ml larutan stok
3	2,4	0,5	4,8	1	2,4	0,5 ml tab. 2 + BHI ad 1 ml
4	1,2	0,5	2,4	1	1,2	0,5 ml tab. 3 + BHI ad 1 ml
5	0,6	0,5	1,2	1	0,6	0,5 ml tab. 4 + BHI ad 1 ml
6	0,30	0,5	0,6	1	0,3	0,5 ml tab. 5 + BHI ad 1 ml
7	0,15	0,5	0,30	1	0,15	0,5 ml tab. 6 + BHI ad 1 ml
8	0,075	0,5	0,15	1	0,075	0,5 ml tab. 7 + BHI ad 1 ml
9	0,0375	0,5	0,75	1	0,0375	0,5 ml tab. 8 + BHI ad 1 ml
10	0,01875	0,5	0,375	1	0,01875	0,5 ml tab. 9 + BHI ad 1 ml
11	0,0085	0,5	0,01875	1	0,0085	0,5 ml tab.10 + BHI ad 1 ml lalu buang 0,5 ml

Lampiran 21. Pembuatan Media

1. Formulasi dan pembuatan Mueller Hinton Agar (MHA)

- Beef, dehydrated infusion 300 g
- Casien hydrolysate 17,5 g
- Strach 1,5 g
- Agar-Agar 17 g
- Suspensikan 38 g bahan diatas dalam 1000 ml aquadest, panaskan sampai larut sempurna. Sterilisasi pada autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. Formulasi Endo Agar (EA)

- Pepton from meat 10 g
- Di potassium hydrogen fosfat 3,5 g
- Laktosa 10 g
- Sodium sulfit 2,5 g
- Fuchsin 0,4 g
- Agar-agar 12,5 g
- pH 7,4
- Suspensikan 38 g bahan diatas dengan aquadest sebanyak 1000 ml, panaskan sampai larut sempurna kemudian tambah 1 ml reagen natrium sulfit 10% aduk ad homogen. Sterilisasi pada autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

3. Formulasi dan pembuatan Brain Heart Infusion (BHI)

- Brain infusion 12,5 g
- Heart infusion 5 g
- Fructose peptone 10 g
- Glucose 2 g
- Sodium chloride 5 g
- Di-sodium hydrogen phosphate 2,5 g
- Suspensi 37 g bahan diatas dalam 1000 ml aquadest, panaskan sampai larut sempurna. Sterilisasi pada autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

4. Formulasi dan pembuatan Sulfide Indol Motility (SIM)

- Peptone from casein 12,5 g
- Peptone from meat 5 g
- Ammonium iron (II) citrate 10 g
- Sodium thiosulfate 0,2 g
- Agar-agar 0,2 g
- Suspensikan 30 g bahan diatas dalam 1000 ml aquadest, panaskan sampai larut sempurna. Sterilisasi pada autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

5. Formulasi dan pembuatan Kliger Iron Agar (KIA)

- Peptone from casein 15 g
- Peptone from meat 5 g
- Ammonium Iron (II) citrate 0,5 g
- Meat extract 3 g
- Yeast extract 3 g
- Sodium chloride 0,2 g
- Laktosa 0,2 g
- Glukosa 1 g
- Sodium thiosulfate 0,5 g
- Phenol red 0,024 g
- Agar-Agar 12 g
- pH 7,4
- Suspensikan 55 g bahan diatas dalam 1000 ml aquadest, panaskan sampai larut sempurna. Sterilisasi pada Autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

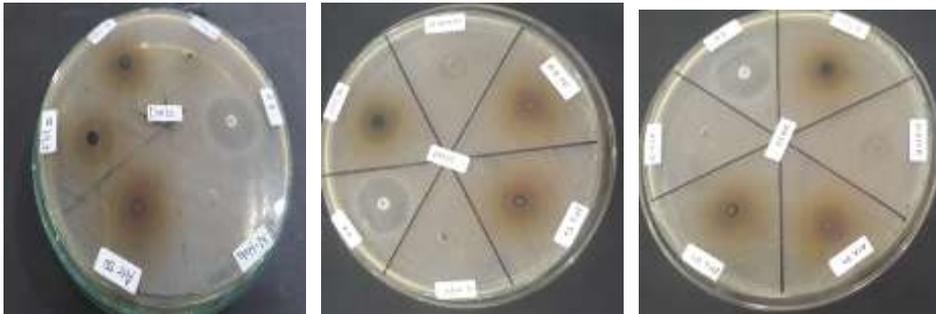
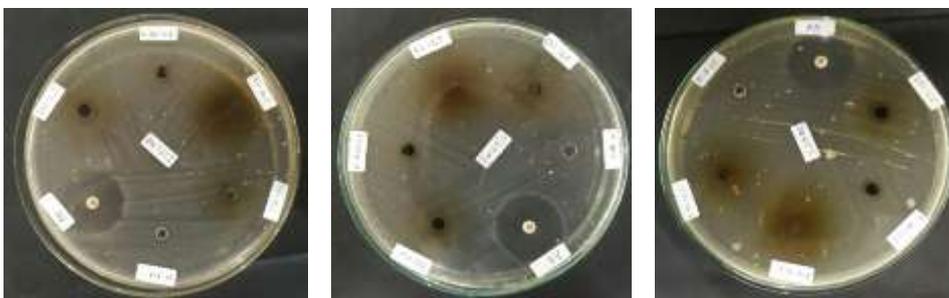
6. Formulasi dan pembuatan Lysine Iron Agar (LIA)

- Peptone from casein 5 g
- Yeast extract 3 g
- Glukosa 1 g
- Lysine monohydrochloride 10 g
- Sodium thiosulfate 0,04 g

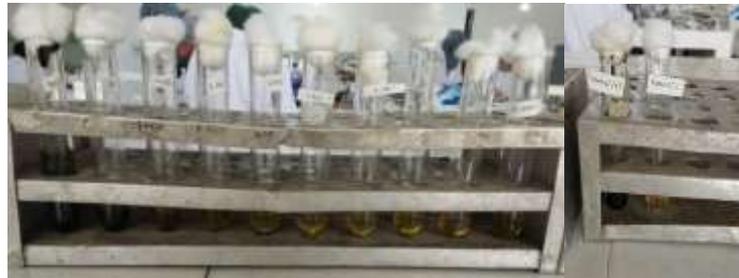
- Ammonium Iron (II) citrate 0,5 g
- Bromo cresol purple 0,02 g
- Agar-agar 0,2 g
- Suspensikan 32 g bahan diatas dalam 1000 ml aquadest, panaskan sampai larut sempurna. Sterilisasi pada autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

7. Formulasi dan pembuatan Citrat Agar

- Ammonium hydrogen fosfat 1 g
- Di-pottasium hydrogen phosphate 3 g
- Sodium chloride 5 g
- Magnesium sulfat 0,2 g
- Bromo thymol blue 0,08 g
- Agar-agar 12,5 g
- Suspensikan 23 g bahan diatas dalam 1000 ml aquadest, panaskan sampai larut sempurna. Sterilisasi pada autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

Lampiran 22. Foto hasil uji aktivitas antibakteri metode difusi**Foto difusi konsentrasi 50 %****Replikasi I, II dan III****Foto difusi konsentrasi 25%****Replikasi I, II dan III****Foto difusi konsentrasi 12,5%****Replikasi I, II dan III**

Lampiran 23. Foto hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat metode dilusi



Tabung dilusi fraksi etil asetat

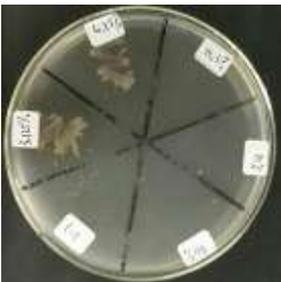
Replikasi I



Replikasi II



Replikasi III

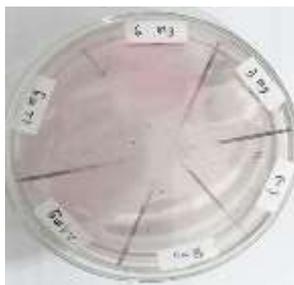


Lampiran 24. Foto hasil uji aktivitas antibakteri kotrimoksazol metode dilusi

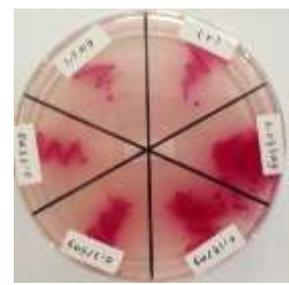


Tabung dilusi kotrimoksazol

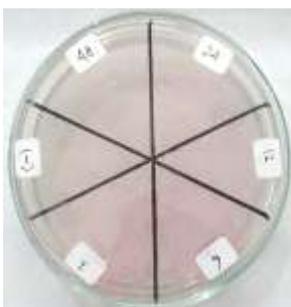
Replikasi I



Replikasi II



Replikasi III



Lampiran 25. Perhitungan Rf Kromatografi Lapis Tipis

Perhitungan Rf menggunakan rumus :

$$Rf = \frac{\text{jarak bercak dari titik awal penotolan sampai batas elusi}}{\text{jarak tempuh fase gerak sampai batas elusi}}$$

Perhitungan Rf :

1. Flavonoid

$$\begin{aligned} Rf \text{ baku quercetin} &= \frac{4}{5} \\ &= 0,8 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Rf \text{ fraksi etil asetat} &= \frac{3,9}{5} \\ &= 0,78 \end{aligned}$$

Lampiran 26. Hasil analisis data uji ANOVA antara fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, ekstrak etanol daun ungu dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% serta kontrol (+) dan kontrol (-).

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2,50	1,168	1	4

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		perlakuan
N		12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,50
	Std. Deviation	1,168
Most Extreme Differences	Absolute	,166
	Positive	,166
	Negative	-,166
Kolmogorov-Smirnov Z		,574
Asymp. Sig. (2-tailed)		,897

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

diameter hambatan

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ekstrak 50%	3	19,3333	,57735	,33333	17,8991	20,7676	19,00	20,00
fraksi n-heksan 50%	3	14,6667	,57735	,33333	13,2324	16,1009	14,00	15,00
fraksi etil asetat 50%	3	23,3333	,57735	,33333	21,8991	24,7676	23,00	24,00
fraksi air 50%	3	17,6667	,57735	,33333	16,2324	19,1009	17,00	18,00
Total	12	18,7500	3,30633	,95446	16,6493	20,8507	14,00	24,00

Test of Homogeneity of Variances

diameter hambatan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,000	3	8	1,000

ANOVA

diameter hambatan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	117,583	3	39,194	117,583	,000
Within Groups	2,667	8	,333		
Total	120,250	11			

Multiple Comparisons

diameter hambatan

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak 50%	fraksi n-heksan 50%	4,66667*	,47140	,000	3,1571	6,1763
	fraksi etil asetat 50%	-4,00000*	,47140	,000	-5,5096	-2,4904
	fraksi air 50%	1,66667*	,47140	,031	,1571	3,1763
fraksi n-heksan 50%	ekstrak 50%	-4,66667*	,47140	,000	-6,1763	-3,1571
	fraksi etil asetat 50%	-8,66667*	,47140	,000	-10,1763	-7,1571
	fraksi air 50%	-3,00000*	,47140	,001	-4,5096	-1,4904
fraksi etil asetat 50%	ekstrak 50%	4,00000	,47140	,000	2,4904	5,5096
	fraksi n-heksan 50%	8,66667*	,47140	,000	7,1571	10,1763
	fraksi air 50%	5,66667*	,47140	,000	4,1571	7,1763
fraksi air 50%	ekstrak 50%	-1,66667*	,47140	,031	-3,1763	-,1571
	fraksi n-heksan 50%	3,00000*	,47140	,001	1,4904	4,5096
	fraksi etil asetat 50%	-5,66667*	,47140	,000	-7,1763	-4,1571

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

diameter hambatan

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
fraksi n-heksan 50%	3	14,6667			
fraksi air 50%	3		17,6667		
ekstrak 50%	3			19,3333	
fraksi etil asetat 50%	3				23,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2,50	1,168	1	4

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		perlakuan
N		12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,50
	Std. Deviation	1,168
Most Extreme Differences	Absolute	,166
	Positive	,166
	Negative	-,166
Kolmogorov-Smirnov Z		,574
Asymp. Sig. (2-tailed)		,897

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

diameter hambatan

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ekstrak 25%	3	14,6667	,57735	,33333	13,2324	16,1009	14,00	15,00
fraksi n-heksan 25%	3	12,6667	,57735	,33333	11,2324	14,1009	12,00	13,00
fraksi etil asetat 25%	3	20,3333	,57735	,33333	18,8991	21,7676	20,00	21,00
fraksi air 25%	3	14,6667	,57735	,33333	13,2324	16,1009	14,00	15,00
Total	12	15,5833	3,02890	,87437	13,6589	17,5078	12,00	21,00

Test of Homogeneity of Variances

diameter hambatan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,000	3	8	1,000

ANOVA

diameter hambatan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	98,250	3	32,750	98,250	,000
Within Groups	2,667	8	,333		
Total	100,917	11			

Multiple Comparisons

diameter hambatan
Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak 25%	fraksi n-heksan 25%	2,00000*	,47140	,012	,4904	3,5096
	fraksi etil asetat 25%	-5,66667*	,47140	,000	-7,1763	-4,1571
	fraksi air 25%	,00000	,47140	1,000	-1,5096	1,5096
fraksi n-heksan 25%	ekstrak 25%	-2,00000*	,47140	,012	-3,5096	-,4904
	fraksi etil asetat 25%	-7,66667*	,47140	,000	-9,1763	-6,1571
	fraksi air 25%	-2,00000*	,47140	,012	-3,5096	-,4904
fraksi etil asetat 25%	ekstrak 25%	5,66667*	,47140	,000	4,1571	7,1763
	fraksi n-heksan 25%	7,66667*	,47140	,000	6,1571	9,1763
	fraksi air 25%	5,66667*	,47140	,000	4,1571	7,1763
fraksi air 25%	ekstrak 25%	,00000	,47140	1,000	-1,5096	1,5096
	fraksi n-heksan 25%	2,00000*	,47140	,012	,4904	3,5096
	fraksi etil asetat 25%	-5,66667*	,47140	,000	-7,1763	-4,1571

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

diameter hambatan

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
fraksi n-heksan 25%	3	12,6667		
ekstrak 25%	3		14,6667	
fraksi air 25%	3		14,6667	
fraksi etil asetat 25%	3			20,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
perlakuan	12	2,50	1,168	1	4

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		perlakuan
N		12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,50
	Std. Deviation	1,168
Most Extreme Differences	Absolute	,166
	Positive	,166
	Negative	-,166
Kolmogorov-Smirnov Z		,574
Asymp. Sig. (2-tailed)		,897

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

diameter hambatan

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ekstrak 12,5%	3	12,0000	1,00000	,57735	9,5159	14,4841	11,00	13,00
fraksi n-heksan 12,5%	3	10,3333	,57735	,33333	8,8991	11,7676	10,00	11,00
fraksi etil asetat 12,5%	3	16,6667	,57735	,33333	15,2324	18,1009	16,00	17,00
fraksi air 12,5%	3	11,3333	,57735	,33333	9,8991	12,7676	11,00	12,00
Total	12	12,5833	2,60971	,75336	10,9252	14,2415	10,00	17,00

Test of Homogeneity of Variances

diameter hambatan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,333	3	8	,802

ANOVA

diameter hambatan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	70,917	3	23,639	47,278	,000
Within Groups	4,000	8	,500		
Total	74,917	11			

Multiple Comparisons

diameter hambatan
Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak 12,5%	fraksi n-heksan 12,5%	1,66667	,57735	,078	-,1822	3,5155
	fraksi etil asetat 12,5%	-4,66667*	,57735	,000	-6,5155	-2,8178
	fraksi air 12,5%	,66667	,57735	,669	-1,1822	2,5155
fraksi n-heksan 12,5%	ekstrak 12,5%	-1,66667	,57735	,078	-3,5155	,1822
	fraksi etil asetat 12,5%	-6,33333*	,57735	,000	-8,1822	-4,4845
	fraksi air 12,5%	-1,00000	,57735	,369	-2,8489	,8489
fraksi etil asetat 12,5%	ekstrak 12,5%	4,66667	,57735	,000	2,8178	6,5155
	fraksi n-heksan 12,5%	6,33333*	,57735	,000	4,4845	8,1822
	fraksi air 12,5%	5,33333*	,57735	,000	3,4845	7,1822
fraksi air 12,5%	ekstrak 12,5%	-,66667	,57735	,669	-2,5155	1,1822
	fraksi n-heksan 12,5%	1,00000	,57735	,369	-,8489	2,8489
	fraksi etil asetat 12,5%	-5,33333*	,57735	,000	-7,1822	-3,4845

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

diameter hambatan

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
fraksi n-heksan 12,5%	3	10,3333	
fraksi air 12,5%	3	11,3333	
ekstrak 12,5%	3	12,0000	
fraksi etil asetat 12,5%	3		16,6667
Sig.		,078	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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