

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI n-HEKSANA, ETIL
ASETAT DAN AIR DARI DAUN ASHITABA (*Angelica keiskei* [Miq.] koidz)
TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 19430**



Oleh :

**Mochamad Arif
18123423A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2016**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI n-HEKSANA, ETIL
ASETAT DAN AIR DARI DAUN ASHITABA (*Angelica keiskei* [Miq.] koidz)
TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 19430**

SKRIPSI



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

Oleh :

**Mochamad Arif
18123423A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2016**

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI n-HEKSANA, ETIL
ASETAT DAN AIR DARI DAUN ASHITABA (*Angelica keiskei* [Miq.] koidz)
TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 19430**

Oleh
Mochamad Arif
18123423 A

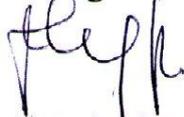
Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 25 Juli 2016



Mengetahui,
Pembina Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Bekasi,

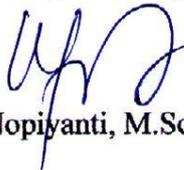
Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt.

Pembimbing Utama



Reslely Harjanti, M.Sc., Apt.

Pembimbing Pendamping,

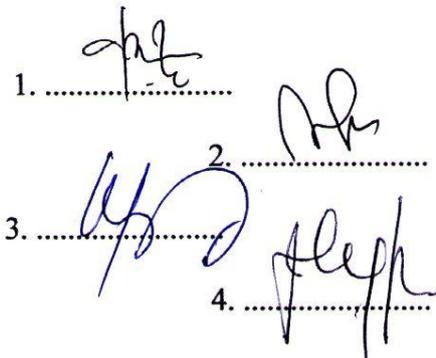


Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt.

Penguji :

1. Opstaria Saptarini, M.Si., Apt.
2. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt.
3. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt.
4. Reslely Harjanti, M.Sc., Apt.

1.
2.
3.
4.

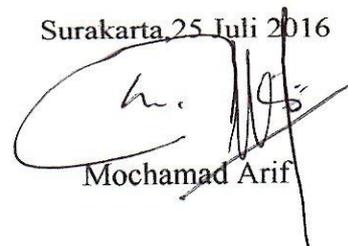


PERNYATAAN

Saya nyatakan dengan ini bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar sarjana 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 dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Saya siap menerima sanksi secara akademis maupun hukum, apabila skripsi ini merupakan jiplakkan dari penelitian atau karya ilmiah skripsi orang lain

Surakarta, 25 Juli 2016



Mochamad Arif

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.*
- ❖ *Bapak, Ibu dan Adek ku tersayang, keluargaku di sidoarjo yang selalu memberikan dukungan, motivasi serta do'a.*
- ❖ *Sahabat-sahabatku, terimakasih untuk pengalaman, canda tawa, dan kebersamaan yang luar biasa.*
 - *Untuk (richsantika y.n) yang selalu sabar memberi motifasi*
 - *Teman praktek skripsi mikrobiologi Syahdad, Lesti, dan James yang selalu membantu*
 - *Untuk teman-teman teori 1, teori FKK 1, kos elite miami dan seluruh angkatan 2012 Kalian semua luar biasa.*
- ❖ *Almamater*
- ❖ *Agama, Bangsa dan Negara*

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur hanya bagi Allah, memuji, memohon pertolongan dan ampunan kepada-Nya. Kami berlindung kepada-Nya dari kejelekan jiwa-jiwa kami dan keburukan perbuatan kami. Pada akhirnya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “ **UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN ASHITABA (*Angelica keiskei* [Miq.] *koidz*) TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 19430** “

Skripsi ini disusun sebagai salah syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi (S. Farm.) di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

Pembelajaran yang luar biasa bagi penulis selama proses penyelesaian skripsi dan studi S1 Farmasi, oleh sebab itu penulis sampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt., Selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini
3. Reslely Harjanti, M.Sc.,Apt selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan petunjuk, bimbingan dan arahan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

4. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt. Selaku dosen pembimbing pendamping yang telah memberikan petunjuk, bimbingan dan arahan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Opstaria Saptarini, M.Si., Apt dan Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan arahan dan penyusunan dalam skripsi ini.
5. Seluruh Dosen, Asisten Dosen, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi atas bantuannya selama penulis menempuh skripsi dan studi.
6. Kepada orangtua ku tercinta kasih sayangnya yang tiada tara dan memberikan motivasi serta semangat dalam pembuatan skripsi ini.
7. 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, 25 Juli 2016



Mochamad Arif

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI.....	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Konteks Permasalahan.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Kegunaan Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Tanaman Ashitaba	5
1. Sistematika tumbuhan Ashitaba	5
2. Nama daerah.....	6
3. Morfologi tumbuhan.....	6
4. Kandungan kimia.....	7
5. Khasiat	8
B. Simplisia	9
1. Pengertian simplisia.....	9
2. Pengumpulan simplisia.....	9
3. Pengeringan	10
C. Ekstraksi	11
1. Pengertian ekstrak.....	11

2. Pengertian ekstraksi.....	11
3. Metode maserasi.....	11
4. Fraksinasi	12
5. Larutan penyari.....	13
D. Demam Tifoid.....	14
1. Pengertian Demam tifoid.....	14
2. Penyebab Demam Tifoid.....	15
3. Toksin	15
E. <i>Salmonella typhi</i>	15
1. Definisi bakteri <i>Salmonella typhi</i>	15
2. Morfologo bakteri.....	15
3. Patogenesis dan patologi	16
F. Antibakteri.....	16
1. Definisi antibakteri	16
2. Mekanisme antibakteri	16
G. Uji Aktivitas Antibakteri	20
1. Metode dilusi	20
2. Metode difusi	21
H. Media.....	22
1. Pengertian media	22
2. Jenis-jenis media pertumbuhan bakteri	22
3. Macam – macam bentuk media	23
I. Sterilisasi	24
J. Kotrimoksazol	25
K. Landasan Teori	26
L. Hipotesis	28
BAB III METODE PENELITIAN	29
A. Populasi dan Sampel.....	29
B. Variabel Penelitian	29
1. Identifikasi variabel utama	29
2. Klasifikasi variabel utama	29
3. Definisi operasional variabel utama	30
C. Bahan dan Alat	31
1. Bahan	31
2. Alat	32
D. Jalannya Penelitian	32
1. Determinasi tanaman	32
2. Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk daun ashitaba... ..	32
3. Kadar lembab.....	32
4. Identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun ashitaba	33
5. Pembuatan ekstrak daun ashitaba secara maserasi	34
6. Uji bebas etanol	35
7. Penetapan persen rendemen.....	35
8. Fraksinasi.....	35

9. Pembuatan suspensi mikroorganisme uji	36
10. Identifikasi bakteri uji.....	36
11. Pengujian aktivitas antibakteri.....	37
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	40
A. Hasil Penelitian Daun Ashitaba.....	40
1. Hasil determinasi tanaman ashitaba (<i>Angelica keiskei</i> [Miq.] <i>koidz</i>)	40
2. Pengambilan sampel.....	40
3. Pembuatan serbuk daun ashitaba.....	41
4. Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun ashitaba	41
5. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun ashitaba.....	42
6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol daun ashitaba	42
7. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun ashitaba	44
8. Hasil fraksinasi ekstrak daun ashitaba.....	44
8.1. Fraksi <i>n</i> -heksana	45
8.2. Fraksi etil asetat	45
8.3. Fraksi air	46
9. Hasil identifikasi bakteri uji <i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	47
10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap <i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430 secara dilusi	48
11. Hasil pengujian daya antibakteri antibiotik kotrimoksazol.	50
12. Hasil identifikasi fraksi daun ashitaba.....	52
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	54
A. Kesimpulan.....	54
B. Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN.....	59

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Tumbuhan ashitaba	5
2. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun ashitaba (<i>Angelica keiskei</i>).....	38
3. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi <i>n</i> -Heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun ashitaba terhadap <i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430 dengan metode dilusi.....	39

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah daun ashitaba	41
2. Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun ashitaba.....	41
3. Rendemen ekstrak etanol daun ashitaba	42
4. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol daun ashitaba.....	43
5. Rendemen hasil fraksi <i>n</i> -heksana daun ashitaba.....	45
6. Rendemen hasil fraksi etil asetat daun ashitaba.....	45
7. Rendemen hasil fraksi air daun ashitaba.....	46
8. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun ashitaba terhadap <i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	48
9. Hasil uji aktivitas antibakteri amoksisilin terhadap bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	50
10. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun ashitaba	51

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Surat keterangan hasil determinasi tanaman	55
2. Foto tanaman ashitaba dan serbuk daun ashitaba	56
3. Foto alat Vortex, <i>Moisture Balance</i> dan Inkubator.....	57
4. Foto evaporator dan ekstrak etanol daun ashitaba	57
5. Foto fraksinasi dan hasil fraksinasi daun ashitaba	58
6. Foto identifikasi senyawa serbuk dan ekstrak daun ashitaba.....	59
7. Foto identifikasi senyawa fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun ashitaba	60
8. Foto hasil identifikasi bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	61
9. Hasil uji dilusi dan inokulasi ekstrak dan fraksi daun ashitaba terhadap <i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	62
10. Hasil uji dilusi dan inokulasi amoksisilin terhadap bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	65
11. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun ashitaba	66
12. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air daun ashitaba.....	66
13. Pembuatan larutan stok konsentrasi 40%	68
14. Perhitungan pengujian dosis antibiotik kotrimoksazol	70
15. Formulasi dan pembuatan media	72

INTISARI

ARIF, M., 2016, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL , FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI DAUN ASHITABA (*Angelica keiskei* [Miq.] *koidz*) TERHADAP *Salmonella typhi* ATCC 19430, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Daun ashitaba (*Angelica keiskei* [Miq.] *koidz*) mengandung alkaloid, saponin, tanin, flavonoid dan terpenoid. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun ashitaba (*Angelica keiskei* [Miq.] *koidz*) terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430.

Ekstraksi daun ashitaba menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, kemudian difraksinasi menggunakan *n*-heksana, etil asetat, dan air. Hasil ekstraksi dan fraksinasi di uji aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430. menggunakan metode dilusi. Konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi yang digunakan adalah 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,313%; 0,156%; 0,078%.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430 dengan Konsentrasi Bunuh Minimum berturut-turut 20%, 40%, 10% dan 40%. Fraksi etil asetat dari daun ashitaba memiliki aktivitas antibakteri paling aktif dibandingkan fraksi *n*-heksana, air dan ekstrak.

Kata kunci: Daun ashitaba (*Angelica keiskei*), *Salmonella typhi* ATCC 19430, antibakteri.

ABSTRACT

ARIF, M. 2016, TEST OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY ETHANOL EXTRACT, FRACTIONS OF *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE AND WATER FROM ASHITABA (*Angelica keiskei* [Miq.] *koidz*) LEAF AGAINST *Salmonella typhi* ATCC 19430, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Ashitaba (*Angelica keiskei* [Miq.] *koidz*) leaf contains alkaloid, saponin, tannin, flavonoid and terpenoid. The study was conducted to determine the antibacterial activity ethanol extract, fractions of n-hexane, ethyl acetate, and water from ashitaba (*Angelica keiskei* [Miq.] *koidz*) leaf against *Salmonella typhi* ATCC 19430.

Ashitaba leaf extraction using maceration method with solvent of 96% ethanol, and then fractionated using n-hexane, ethyl acetate, and water. The results of extraction and fractionation was tested antibacterial activity against *Salmonella typhi* ATCC 19430 using dilution method. The concentration of ethanol extract and fractions used were 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,313%; 0,156%; 0,078%.

The results of this study showed that the ethanol extract, fractions of n-hexane, ethyl acetate and water had antibacterial activity against *Salmonella typhi* ATCC 19430 with Minimum Kill Concentration 20%, 40%, 10% and 40%, respectively. Ethyl acetate fraction of ashitaba leaf had the most active antibacterial activity than the fractions of n-hexane, water and extract.

Keywords: *Angelica keiskei* [Miq.] *koidz*., *Salmonella typhi* ATCC 19430, antibacterial.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Demam tifoid adalah demam yang disebabkan oleh bakteri gram negatif *Salmonella typhi* yang hanya ditemukan pada manusia, menyerang baik pada anak-anak ataupun dewasa segala usia, serta dipengaruhi ras maupun gender (Wheeler 2001). Gejala yang ditimbulkan berupa gejala ringan sampai berat, seperti demam, sakit perut, leukositosis, sembelit, pembesaran limfa, dan diare. Penderita dapat kehilangan nafsu makan, ruam pada wajah, dan bintik-bintik merah. Penyakit yang disebabkan *Salmonella typhi* ini tidak saja terjadi di negara berkembang, tetapi dapat terjadi di negara maju. Angka kejadian infeksi *Salmonella typhi* di seluruh dunia mencapai lebih dari 12,5 juta pertahun dan di Amerika Serikat diperkirakan sekitar 2 juta penderita setiap tahun (Radji & Biomed 2010).

Demam tifoid dapat dicegah dan biasanya dapat diobati dengan antibiotik (Ochiai *et al.* 2008). Pemberian antibiotik empiris yang tepat pada pasien demam tifoid sangat penting, untuk mencegah komplikasi dan untuk mengurangi kematian. Kloramfenikol, ampicillin, dan kotrimoksazol merupakan antibiotik klinik pertama yang telah dipakai selama puluhan tahun sampai timbulnya resistensi yang disebut *Multidrug Resistant Salmonella Typhi* (MDRST) (Sidabutar *et al.* 2010).

Jenis pembagian, klasifikasi, pola kepekaan dan penemuan antibiotik baru seringkali menyulitkan klinisi dalam menentuka pilihan antibiotika yang tepat ketika menangani suatu kasus. Hal ini merupakan salah satu faktor pemicu terjadinya salah satu resisten (Peterson 2005). Adanya resisten terhadap antibiotika mendorong dilakukannya penelitian untuk mencari alternatif lain yang lebih aman, misalnya penggunaan tanaman yang memiliki potensi sebagai antibakteri.

Indonesia kaya akan tanaman alam sebagai obat tradisional, diantaranya adalah tanaman daun ashitaba (*Angelica keiskei*), Ashitaba (*Angelica keiskei*) adalah salah satu jenis tanaman obat, merupakan tanaman yang belum banyak dikenal di Indonesia sedangkan di Jepang tanaman ashitaba dikonsumsi sebagai sayuran yang populer di Jepang, berpotensi sebagai antibakteri, antijamur, antitumor, antiinflamasi (Bove 2013). Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Suhartati dan Virgianti 2015) membuktikan bahwa ekstrak etanol daun ashitaba (*Angelica keiskei*) memiliki perbedaan daya hambat terhadap bakteri *staphylococcus aureus*

Penelitian ini, menggunakan ekstrak daun ashitaba dengan metode maserasi. Metode maserasi dipilih karena tidak memakai pemanasan serta merupakan ekstraksi yang paling sederhana. Keuntungan metode maserasi yaitu cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah didapatkan (Depkes 1986). Setelah ekstraksi dengan maserasi kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi. Pada proses fraksinasi digunakan pelarut nonpolar, semipolar, dan polar. Pada pelarut nonpolar digunakan n-heksana karena sifatnya non-polar maka

dapat menyari senyawa kimia yang nonpolar pada ekstrak daun ashitaba. Pelarut semipolar digunakan etil asetat untuk melarutkan senyawa semipolar. Air sebagai pelarut polar untuk melarutkan senyawa polar. Berdasarkan uraian maka diadakan penelitian tentang uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun ashitaba terhadap bakteri *Salmonella Typhi*.

B. Konteks Permasalahan

Permasalahan dalam penelitian ini adalah:

Permasalahan pertama, apakah ekstrak, fraksi n-heksana, etil asetat dan fraksi air dari daun Ashitaba (*Angelica keiskei*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* (ATCC 19430)?

Kedua, berapa Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun ashitaba ?

Ketiga, ekstrak, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air, manakah yang mempunyai aktivitas antibakteri paling besar terhadap *Salmonella typhi* (ATCC 19430) ?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

Pertama, untuk mengetahui dan membuktikan aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi n-heksana, etil asetat dan air dari daun ashitaba (*angelica keiskei*) terhadap bakteri *Salmonella typhi* (ATCC 19430).

Kedua, untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun ashitaba.

Ketiga, untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun ashitaba yang paling besar aktivitasnya terhadap *Salmonella typhi* (ATCC 19430).

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan tambahan pengetahuan khususnya obat tradisional yang bisa digunakan sebagai masukan bagi masyarakat dalam upaya pemanfaatan daun ashitaba (*angelica keiskei*) sebagai obat tradisional khususnya sebagai obat antibakteri.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

B. Tumbuhan Ashitaba

1. Sistematika tumbuhan Ashitaba



Tumbuhan ashitaba memiliki taksonomi sebagai berikut:

- Kerajaan : Plantae
- Divisi : Spermatophyta
- Sub divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledonae
- Sub kelas : sympetalae
- Bangsa : Apiales
- Keluarga : Apiaceae
- Marga : Angelica
- Jenis : *Angelica keiskei* (Miq.) Koidz (Soepomo 1997).

2. Nama daerah

Tanaman asitaba memiliki nama lain daun hari esok, seledri jepang (Indonesia), Asitaba (Jepang).

3. Morfologi tumbuhan

Ashitaba merupakan suatu jenis tanaman tahunan yang abadi. Asitaba tumbuh dengan baik di daerah dataran tinggi dengan kedalaman tanah yang cukup lembab. Asitaba termasuk tanaman monokotil dan termasuk daun lengkap yang terdiri dari pelepah (upih), tangkai, dan helaian. Daun asitaba termasuk daun majemuk karena mulai pelepah sampai ujung tangkai daun tumbuh anak daun yang berjumlah tiga atau lebih. Pada anak daun asitaba mempunyai anak tangkai yang seolah-olah seperti tangkai daun untuk daun yang melekat padanya. Ujung daun asitaba meruncing dengan pangkal daun yang tumpul (Soepomo 1997).

Susunan tulang daun tanaman asitaba ada dua macam, yaitu menjari dan menyirip. Hal ini dilihat dari dua sudut pandang yang berbeda, pertama jika dilihat dari bagian tempat melekatnya daun tanaman tersebut tulang daunnya menjari, sedangkan daun Asitaba dikatakan sebagai susunan tulang daun menyirip karena pada helaian dari hasil torehan daun tersebut tulang daunnya tersusun menyirip. Daun Asitaba yang masih muda berwarna hijau kekuningan sedangkan daun yang sudah dewasa berwarna hijau tua. Tepi daun Asitaba yaitu bergerigi dengan duri berwarna putih yang tidak terlalu keras dan kaku (Soepomo 1997).

4. Kandungan kimia

Daun, batang serta umbi tanaman asitaba mengandung alkaloid, saponin, tanin, fenolik, flavonoid, triterfenoid, dan glikosida, khusus untuk steroid ditemukan hanya pada bagian daun (Sembiring & Monai 2011).

4.1. Alkaloid. Menurut Suzi Martina 2013, diacu dari Lenny (2006). Alkaloid merupakan golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik. Hampir semua alkaloid yang ditemukan di alam mempunyai keaktifan biologis tertentu, ada yang sangat beracun dan adapula yang sangat berguna bagi pengobatan.

4.2. Saponin. Saponin merupakan senyawa dalam bentuk glikosida yang tersebar luas dalam tumbuhan tingkat tinggi. Saponin membentuk larutan koloidal dalam air dan membentuk busa yang mantap jika dikocok dan tidak hilang dengan penambahan asam. Saponin paling cocok diekstraksi memakai etanol atau metanol panas 70% (Harborne 1987). Dikenal dua jenis saponin, yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan struktur steroid tertentu yang mempunyai rantai samping spiroketal. Kedua jenis saponin memiliki efek menghambat steroid anak ginjal, serta menghambat dihidrogenase jalur prostaglandin yang berperan menyebabkan peradangan (Robinson 1995).

4.3. Flavonoid. Flavonoid merupakan golongan fenol alam yang melingkari 15 atom karbon inti dasarnya. Flavonoid tersusun dalam konfigurasi

$C_6-C_3-C_6$ yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan-satuan yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Markham 1988). Metanol, etanol 70%, aseton merupakan pelarut yang sering digunakan untuk ekstraksi flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang dapat menghambat banyak reaksi oksidasi secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung radikal hidroksi dan superoksida yang baik, sehingga dapat melindungi membran lipid terhadap reaksi yang merusak (Robinson 1995).

4.4. Triterpenoid. Triterpenoid merupakan senyawa kimia yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik, yaitu skualen. Senyawa ini berstruktur siklik yang nisbi rumit, kebanyakan berupa alkohol, aldehida atau asam karboksilat. Berupa senyawa berbentuk kristal, memiliki titik leleh tinggi dan aktif optik, yang umumnya sukar dicirikan karena tak ada kereaktifan kimianya (Harborne 1987).

4.5. Tanin. Tanin merupakan suatu zat kompleks yang terdapat campuran polifenol yang sukar dipisahkan, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit, sehingga dapat digunakan sebagai pertahanan bagi tumbuhan, membantu mengusir hewan pemangsa tumbuhan, mempunyai aktifitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tunas dan dapat mendenaturasi protein. Tanin larut dalam air tapi tidak larut dalam pelarut organik nonpolar (Robinson 1995).

5. Khasiat

Daun Asitaba mengandung alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, triterfenoid, glikosida dan steroid (Sembiring & Monai 2011). Di antara senyawa-senyawa

tersebut flavonoid mempunyai bermacam-macam efek, yaitu efek antitumor, immunostimulan, antioksidan, analgesik, antiradang (antiinflamasi), antivirus, antibakteri, antifungi, antidiare, antihepatotoksik, antihiperqlikemik, dan sebagai vasodilator (Sumastuti & Sonlimar 2002).

C. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan baku alami yang digunakan untuk membuat ramuan obat tradisional yang belum mengalami pengolahan, kecuali proses pengeringan. Ditinjau dari asalnya, simplisia digolongkan menjadi simplisia nabati dan simplisia hewani. Simplisia hewani berasal dari hewan, baik yang masih utuh, organ-organnya, maupun zat-zat yang dikandungnya yang berguna sebagai obat dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia nabati berasal dari tanaman, baik yang masih utuh bagian-bagiannya, maupun zat-zat nabati yang dipisahkan dari tanamannya dan belum berupa zat kimia murni (Said 2007).

2. Pengumpulan simplisia

Simplisia yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia nabati dan bagian yang digunakan adalah daun. Kadar senyawa aktif dalam satu simplisia berbeda-beda tergantung pada bagian yang digunakan, umur tanaman atau bagian tanaman saat dipanen, waktu panen dan tempat tumbuh. Pemanenan atau pengumpulan dilakukan pada saat daun yang telah tua. Daun yang diambil dipilih yang telah membuka sempurna dan terletak dibagian cabang atau batang yang

menerima sinar matahari sempurna, sehingga daun tersebut terjadi kegiatan asimilasi sempurna (Depkes 1985).

3. Pengeringan

Pengeringan bertujuan agar simplisia tidak mudah rusak karena terurai oleh enzim yang terdapat dalam bahan baku. Enzim yang masih ada airnya akan menguraikan bahan berkhasiat yang ada, sehingga bahan kimia tersebut rusak dan mencegah tumbuhnya jamur dan mikroba lain (Gunawan & Mulyani 2004).

Cara pengeringan dibedakan menjadi dua metode yaitu pengeringan dalam udara terbuka dan pengeringan dalam panas buatan. Pengeringan dalam udara terbuka dapat dilakukan di bawah sinar matahari langsung atau terlindung dari cahaya yaitu diangin-anginkan, hal ini tergantung bahan tumbuhan yang akan dikeringkan, pada pengeringan dengan sinar matahari langsung akan menyebabkan terjadinya penguraian bahan berkhasiat. Pelaksanaan pengaturan pengeringan ditentukan dari bentuk atau bagian bahan yang akan dikeringkan. Bagian yang tipis seperti bunga dan daun tidak perlu dipotong, pada bagian yang keras seperti akar, biji, batang, kayu, dan kulit buah sebaiknya dipotong terlebih dahulu. Pengeringan untuk daun yang paling baik adalah dengan cara diangin-anginkan atau terlindung dari sinar matahari langsung. Pengeringan menggunakan panas buatan adalah pengeringan menggunakan mesin pemanas bertenaga listrik atau diesel. Mesin pengering ini, panas yang dihasilkan stabil, pengeringan lebih terkontrol, tidak tergantung lagi pada cuaca, dan waktu yang dibutuhkan sedikit. Kualitas simplisia yang dihasilkan akan lebih baik (Depkes 1985).

D. Ekstraksi

1. Pengertian ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat atau cair yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstrak berdasarkan konsistensinya dibedakan menjadi tiga, yaitu ekstrak cair, ekstrak kental, dan ekstrak kering. Ekstrak cair merupakan sediaan cair hasil dari penyarian simplisia. Ekstrak kental merupakan sediaan kental yang dibuat dari simplisia kemudian diuapkan pelarutnya. Ekstrak kering merupakan sediaan yang terbentuk bubuk yang dibuat dari hasil tarikan simplisia yang diuapkan dengan pelarut hingga kering (Voigt 1995).

2. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi ialah penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan larut. Pelarut yang diinginkan dalam ekstraksi harus dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan seminimal mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel 1989).

3. Metode maserasi

Maserasi adalah teknik penyarian sederhana, maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dalam masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut karena adanya konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara di

luar sel dengan di dalam sel (Depkes 1986). Bahan simplisia yang dihaluskan sesuai dengan syarat farmakope (terpotong-potong atau berupa serbuk kasar) disatukan dengan pelarut.

Rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna) dan dikocok kembali. Waktu lamanya maserasi berbeda-beda, masing-masing farmakope mencantumkan 4-10 hari. Menurut pengalaman 5 hari telah memadai, selesai waktu maserasi, artinya keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan masuk ke dalam cairan, telah tercapai maka proses difusi segera berakhir. Persyaratannya adalah rendaman harus dikocok berulang-ulang. Melalui upaya ini dapat dijamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat dari cairan. Keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Semakin besar perbandingan simplisia terhadap cairan pengestrasi akan semakin banyak hasil yang diperoleh, maserasi biasanya dilakukan pada temperatur 15-20°C (Voigt 1995).

4. Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu cara untuk memisahkan golongan utama dari suatu golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan terjadi fraksi yang berbeda-beda. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar. Ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Pelarut secara selektif akan

memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari dengan pelarut polar (Harbone 1987).

5. Larutan penyari

Cairan penyari harus dapat menyari seluruh serbuk dan terus menerus mendesak larutan yang memiliki konsentrasi lebih tinggi untuk keluar. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria murah, mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, mudah menguap, tidak mudah terbakar serta selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat (Depkes 1986).

5.1. Etanol. Etanol digunakan sebagai cairan penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% keatas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak penguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakinon, flavonoid, steroid, damar dan klorofil (Depkes 1986)

5.2. n-heksana. n-heksana merupakan pelarut non polar sehingga cocok untuk menyari senyawa yang bersifat non polar dalam proses fraksinasi, mempunyai sifat mudah terbakar, mudah menguap, tidak berbau dan tidak dapat larut dalam air dan alkohol. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut n-heksan yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti terpenoid, triterpenoid, dan sterol, dan fenil propanoid (Depkes 1987).

5.3. Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut semi polar, mudah menguap dan mudah terbakar, maka penyimpanannya dalam wadah tertutup dan terlindung dari panas. Etil asetat merupakan cairan jernih tidak berwarna pada suhu kamar

dengan bau khas seperti buah, larut dalam 15 bagian air bercampur etanol dan eter, titik didihnya 76°C. Senyawa yang dapat larut ke dalam pelarut ini adalah flavonoid. Etil asetat dapat juga melarutkan senyawa alkaloid, senyawa-senyawa fenolik seperti: fenol, asam fenolat, fenil propanoid, dan antrakinon (Harborne 1987).

5.4. Air. Air dipertimbangkan sebagai pelarut karena stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah. Air dapat melarutkan enzim sehingga yang terlarut dengan adanya air akan menyebabkan reaksi enzimatik, yang mengakibatkan penurunan mutu, tetapi dengan adanya air akan mempercepat proses hidrolisis. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan disamping zat aktif ikut tersari juga zat lain yang diperlukan mengganggu proses penyarian. Air disamping melarutkan garam alkaloid, minyak penguap, glikosida, tanin dan gula, juga melarutkan pati, protein, lendir, lilin, lemak, pectin, zat warna dan asam organik (Depkes 1986).

E. Demam Tifoid

1. Pengertian Demam tifoid

Demam tifoid adalah satu penyakit sistemik bersifat akut yang disebabkan oleh bakteri *salmonella typhi*. Demam paratifoid merupakan terminologi lain yang erat kaitannya dengan demam tifoid. Demam paratifoid secara patologik maupun klinis adalah sama dengan dema tifoid, namun biasanya lebih ringan. Demam paratifoid disebabkan oleh spesies *salmonella enteridis* (Sumarmo *et al* 2002).

2. Penyebab Demam Tifoid

Menurut Pudiastuti (2011) bakteri *salmonella typhi* adalah penyebab utama dema tifoid. Pencemaran air minum dan sanitasi yang buruk. Makanan dan minuman yang telah tercemar bakteri salmonella, mengkonsumsi makanan yang disiapkan oleh tersangka penderita demam tifoid yang tidak mencuci tangan dengan baik.

3. Toksin

Seperti pada semua kuman gram negative, dinding sel salmonellae mengandung lipopolisakarida. Lipoposhakarida ini dilepaskan waktu sel lisis dan berperanan sebagai endotoksin (Jawetz *et al* 1986).

F. *Salmonella typhi*

4. Definisi bakteri *Salmonella typhi*

Klasifikasi menurut Dwidjoseputro (1989) :

Divisi	: Protophyta
Class	: Schizophyta
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: Salmonella
Spesies	: <i>Salmonella typhi</i>

5. Morfologi bakteri

Bakteri salmonella adalah kuman gram negative, tidak berspora yang panjangnya bervariasi. Kebanyakan spesies bergerak, dengan flagel

peritrih, salmonella tumbuh cepat pada perbenihan biasa tetapi tidak meragi laktosa, sukrosa, atau salisin. Salmonella resisten terhadap pembekuan dalam air dan terhadap zat-zat kimia tertentu. salmonella dapat diidentifikasi dengan tes-tes biokimia dan analisis analgetik (Jawetz *et al* 1986).

6. Patogenesis dan patologi

Pada semua bentuk infeksi salmonella organisma masuk melalui mulut dan dapat mengakibatkan infeksi klinik atau subklinik. Salmonellae dapat menghasilkan 3 macam penyakit utama, tetapi bentuk campuran sering terjadi (Jawetz *et al* 1986).

G. Antibakteri

3. Definisi antibakteri

Antibakteri adalah suatu bahan yang dapat membasmi bakteri pada umumnya, khususnya yang bersifat patogen pada manusia. Antibakteri berdasarkan toksisitas selektif dalam menghambat pertumbuhan tanpa merusak inang, berupa zat yang hanya menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan membunuh (bakterisid) (Radji 2010).

4. Mekanisme antibakteri

Antibakteri yaitu suatu zat yang dapat mematikan atau menghambat pertumbuhan dari bakteri. Khususnya yang bersifat patogen bagi manusia berupa zat kimia sintesis atau produk alam. Zat antibakteri dengan interaksi bakteri dapat bersifat bakteriostatik (hanya menghambat) atau dapat bersifat bakterisid (membunuh bakteri), perbedaan kedua sifat tersebut terutama didasarkan pada

dosis yang digunakan. Banyak obat antibakteri memiliki efek yang mematikan terhadap bakteri secara *in vitro* tetapi dapat cepat pula merubahnya menjadi resisten terhadap kebanyakan obat untuk bekerja melawan infeksi oleh bakteri (Syarif *et al* 1995). Antibakteri yang ideal memiliki toksisitas selektif, berarti obat antibakteri tersebut hanya berbahaya bagi bakteri, tetapi relatif tidak membahayakan bagi hospes (Pelczar *et al* 1986).

2.1. Antibakteri yang menghambat metabolisme sel mikroba.

Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini ialah sulfonamid, trimetoprim, asam p-aminosalisilat (PAS) dan sulfon. Mekanisme kerja ini diperoleh bakteriostatik. Bakteri membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, kuman patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA). Sulfonamid dan sulfon memang bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional, akibatnya kehidupan mikroba akan terganggu. Sifat kompetisi, efek sulfonamid dapat diatasi dengan meningkatkan kadar PABA. Dihidrofolat harus diubah menjadi bentuk aktifnya yaitu asam tetrahidrofolat. Enzim dihidrofolat reduktase yang berperan disini dihambat oleh trimetoprim, sehingga asam dihidrofolat tidak dapat direduksi menjadi asam tetrahidrofolat yang fungsional (Akhyar 2010).

2.2. Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel bakteri.

Dinding sel bakteri terdiri atas polipeptidoglikon. Polipeptidoglikon yaitu suatu kompleks polimer glikopeptida. Salah satu kerja antibakteri adalah menghambat

sintesis dinding sel. Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Ganiswarna 1995). Contoh antibiotik yang bekerja menghambat sintesis bakteri adalah penisilin, sefalosporin, karbapenem, monobaktam, dan inhibitor sintesis dinding sel lainnya seperti vancomycin, basitrasin, fosfomycin, dan daptomycin (Bakung 2014). Antibiotik beta-laktam melintasi membran luar dan memasuki organisme-organisme gram negatif melalui saluran protein membran luar (Pringgenies 2010).

2.3. Antibakteri yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri.

Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah polimiksin, golongan polien serta berbagai antibakteri kemoterapeutik, umpamanya antiseptik *surface active agents*. Polimiksin sebagai senyawa amonium-kuatener dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel mikroba. Polimiksin tidak efektif terhadap kuman Gram-positif karena jumlah fosfor bakteri ini rendah. Kuman Gram-negatif yang menjadi resisten terhadap polimiksin, ternyata jumlah fosfornya menurun. Antibiotik polien bereaksi dengan struktur sterol yang terdapat pada membran sel fungus sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membrane tersebut. Bakteri tidak sensitif terhadap antibiotik polien, karena tidak memiliki struktur sterol pada membran selnya. Antiseptik yang mengubah tegangan permukaan (*surface active agents*), dapat merusak permeabilitas selektif dari membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Akhyar 2010).

2.4. Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel bakteri. Obat yang termasuk kelompok ini ialah golongan aminoglikosid, makrolid, linkomisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol. Sel mikroba perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA, pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S, berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan berbagai cara streptomisin berikatan dengan komponen ribosom 30S dan menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein, akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel mikroba. Antibiotik aminoglikosid lainnya yaitu gentamisin, kanamisin, dan neomisin memiliki mekanisme kerja yang sama namun potensinya berbeda. Eritromisin berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptide, rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru.

Linkomisin juga berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat sintesis protein. Tetrasiklin berikatan dengan ribosom 30S dan menghalangi masuknya kompleks tRNA- asam amino pada lokasi asam amino. Kloramfenikol berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat pengikatan asam amino baru pada rantai polipeptida oleh enzim peptidil transferase (Akhyar 2010).

2.5. Antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri. DNA, RNA dan protein memegang peranan penting dalam kehidupan normal sel.

Salah satu kerja antibakteri yang lain adalah mekanisme berikatan dengan enzim polimerase RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut (Ganiswara 1995). Contoh antibiotik yang mengganggu sintesis DNA ini adalah metronidasol, kinolon, novobiosin. Contoh yang mengganggu RNA contohnya seperti rifampisin (Bakung 2014).

G. Uji Aktivitas Antibakteri

1. Metode dilusi

Metode dilusi ada 2 macam yaitu dilusi cair dan dilusi padat, pada prinsipnya metode ini dilakukan dengan mengencerkan zat yang akan diuji menjadi beberapa konsentrasi, dilusi cair masing-masing konsentrasi ditambah suspensi bakteri dalam media, sedangkan dilusi padat tiap konsentrasi zat uji dicampur media agar, lalu ditanami bakteri, hasil yang didapat metode ini adalah Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi (pengenceran tabung dapat menentukan secara kuantitatif) konsentrasi terkecil suatu obat dapat menghambat pertumbuhan kuman dalam pembenihan cair. Pembenihan yang dipakai harus merupakan pembenihan yang dapat menumbuhkan kuman secara optimum dan tidak menetralkan obat yang digunakan. Metode dilusi dilakukan dengan cara membuat suatu seri konsentrasi yang terdiri atas beberapa tabung reaksi, masing-masing tabung ditambahkan bahan uji yang akan diperiksa kecuali tabung untuk kontrol positif, kemudian ditambahkan bakteri yang telah diencerkan 1:1000 ke dalam tiap-tiap tabung reaksi kecuali untuk kontrol negatif (Bonang & Koeswardono 1982).

Keuntungan metode difusi yaitu memungkinkan adanya suatu hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah obat yang diperlukan untuk menghambat dan membunuh bakteri yang diperiksa. Kekurangannya adalah dapat mempersulit pengamatan, membutuhkan alat yang banyak, dan tidak praktis (Jawetz *et al* 1986).

2. Metode difusi

Metode difusi adalah suatu uji aktifitas dengan menggunakan cakram yang berliang renik atau suatu silinder tidak beralas yang mengandung obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada pembenihan padat yang telah ditanami dengan biakan bakteri yang akan diperiksa. Setelah inkubasi, garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri yang diperiksa. Metode ini zat yang akan ditentukan aktivitas anti mikroba berdifusi pada lempeng agar *Muller Hinton* yang telah ditanami mikroba yang akan diuji. Dasar penggunaannya adalah terbentuk atau tidaknya zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekeliling cakram atau silinder yang berisi zat anti mikroba (Harminta 2004).

Prinsip penggunaan antibakteri didasarkan pada dua pertimbangan utama, yaitu penyebab infeksi dan faktor pasien. Pemberian antibakteri yang paling ideal adalah berdasarkan hasil pemeriksaan mikrobiologis dan uji kepekaan kuman (Tan dan Raharja 1986).

H. Media

2. Pengertian media

Media adalah bahan atau campuran bahan yang digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangbiakan mikroba. Media yang digunakan harus dalam keadaan steril, tidak ditumbuhi mikroba lain yang tidak diharapkan (Suriawiri a 2005). Media tumbuh bakteri harus mengandung semua nutrisi yang mudah digunakan bakteri, mempunyai tekanan osmotik, tegangan permukaan dan pH yang sesuai, media tidak mengandung zat-zat penghambat dan media harus steril (Suryono 1995).

2. Jenis-jenis media pertumbuhan bakteri

Media sintetik, media ini digunakan untuk menumbuhkan bakteri kemoheterotrof. Organisme yang banyak menumbuhkan banyak faktor pertumbuhan disebut *fastidious*, misalnya *Lactobacillus*.

Media kompleks, media ini mengandung nutrisi tinggi, yang terdiri atas ekstrak ragi, ekstrak daging, tumbuhan, ataupun protein dari sumber lain. Media kompleks yang berbentuk cairan disebut *nutrient broth*, sedangkan yang ditambahkan media agar disebut *nutrient agar*.

Media biakan khusus, bakteri tidak dapat tumbuh dalam media buatan laboratorium, sebagai contoh *Mycobacterium leprae*, bakteri ini masih ditumbuhkan di dalam binatang armadillo.

Media selektif dan diferensial, media selektif dan diferensial digunakan untuk mendeteksi ada tidaknya bakteri spesifik yang berhubungan dengan penyakit atau sanitasi yang buruk. Media selektif dirancang untuk menekan

pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan dan mendukung pertumbuhan bakteri yang diinginkan, contoh *Bismuth Sulfite Agar* digunakan untuk mengisolasi bakteri *Salmonella typhi* pada tinja, media *Salmonella Shigella Agar* untuk mengisolasi bakteri *Shigella dysenteriae*, *Vogel Jonson Agar* untuk mengisolasi bakteri *Staphylococcus aureus*. Media diferensial memudahkan pembedaan koloni bakteri yang diinginkan dari koloni lain yang tumbuh pada lempeng media yang sama (Radji 2010).

3. Macam – macam bentuk media

Bentuk media ditentukan oleh ada tidaknya penambahan zat pematik seperti agar-agar, gelatin, dan sebagainya. Bentuk media dikenal tiga jenis yaitu media padat, cair dan semi padat.

Media padat apabila ke dalam media ditambahkan antara 12-15 gram tepung agar-agar per 1.000 ml media. Jumlah tepung agar-agar yang ditambahkan tergantung pada jenis dan kelompok mikroba yang ditambahkan. Jenis media yang memerlukan kadar air tinggi, maka jumlah tepung agar-agar harus rendah, tetapi untuk jenis media yang memerlukan kandungan air rendah penambahan tepung agar harus sedikit. Media padat umumnya dipergunakan untuk bakteri, ragi, jamur dan kadang-kadang juga mikroalga.

Media cair apabila kedalam media tidak ditambahkan zat pematik, biasanya media cair dipergunakan untuk perbanyakan mikroalga tetapi juga mikroba lain, terutama bakteri dan ragi. Media semi cair / semi padat apabila penambahan zat pematik hanya 50 % atau kurang dari yang seharusnya. Umumnya diperlukan

untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup aerobik atau fakultatif (Suriawiria 1985).

I. Sterilisasi

Hampir semua media pada tindakan yang dilakukan dalam diagnosemikrobiologis, sterilitas sangat diutamakan baik alat-alat yang dipakai maupun medianya. 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. Terdapat berbagai cara sterilisasi yang dikenal dan pemilihan cara sterilisasi tergantung dari bahan atau alat yang akan disterilisasi. Cara sterilisasi tersebut adalah dengan pemanasan, filtrasi, penyinaran dengan menggunakan sinar gelombang pendek (radiasi) atau dengan cara khemis (Widyarto 2009).

Metode-metode yang seringkali digunakan dalam proses sterilisasi bahan-bahan makanan dan alat-alat laboratorium pada umumnya menggunakan panas. Dalam bakteriologi dikenal tiga macam sterilisasi dengan cara pemanasan untuk memusnahkan semua mikroorganisme yang hidup. Ketiga cara tersebut adalah sterilisasi dengan menggunakan udara kering, sterilisasi dengan menggunakan uap air panas dan sterilisasi dengan cara dipanaskan sampai mendidih (Timotius 1978).

Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah dan kering, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar-X, sinar α , sinar gamma dan sinar UV. Sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin. Sterilisasi secara

mekanik yaitu penggunaan saringan atau filter untuk bahan yang akan mengalami perubahan atau penguraian akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi (Dalimarta 2008).

J. Kotrimoksazol

Antibiotik yang digunakan sebagai pembanding pada penelitian ini adalah suspensi kotrimoksazol, karena *Salmonella typhi* merupakan bakteri yang sensitif terhadap antibakteri sediaan suspensi kotrimoksazol. Sediaan suspensi kotrimoksazol merupakan kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol. Trimetoprim dan sulfametoksazol menghambat reaksi enzimatik obligat pada dua tahap yang berurutan pada bakteri, sehingga kombinasi kedua obat memberikan efek sinergis (Ganiswara 1995).

Mekanisme kerja sediaan suspensi kotrimoksazol adalah aktivitas bakteri kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol berdasarkan kerjanya pada tahap dua tahap yang berurutan pada reaksi enzimatik untuk pembentukan asam tetrahidrofolat. Trimetoprim memblokir produksi asam tetrahidrofolat dari asam dihidrofolat, dengan cara menghambat enzim dihidrofolat reduktase bakteri. Sulfametoksazol mencegah sintesis asam dihidrofolat, sehingga bakteri bersaing dengan asam amino benzoate (PABA). Frekuensi terjadinya resistensi terhadap kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol lebih rendah dari pada terhadap masing-masing obat, oleh karena mikroba yang resisten terhadap salah satu komponen masih peka terhadap komponen lainnya (Pediatri 2005).

K. Landasan Teori

Penyakit typhus atau demam tifoid (bahasa Inggris : *typhoid fever*) yang biasa juga disebut typhus atau typhes dalam bahasa Indonesianya, merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella enterica*, khususnya turunannya yaitu *Salmonella typhi* terutama yang menyerang bagian saluran pencernaan. Demam tifoid adalah penyakit infeksi akut yang selalu ada di masyarakat (endemik) di Indonesia, mulai dari usia balita, anak-anak dan dewasa. Demam tifoid sebagai demam menular yang disebabkan oleh bakteri sehingga menyebabkan bintik-bintik merah di dada dan perut serta iritasi parah pada usus (Titus 2009).

Demam tifoid dapat dicegah dan biasanya dapat diobati dengan antibiotik (ochiai *et al* 2008). Pemberian antibiotik empiris yang tepat pada pasien demam tifoid sangat penting, untuk mencegah komplikasi dan untuk mengurangi kematian. Kloramfenikol, ampicillin, dan kotrimoksazol merupakan antibiotik klinik pertama yang telah dipakai selama puluhan tahun sampai timbulnya resistensi yang disebut *Multidrug Resistant Salmonella Typhi* (MDRST) (Sidabutar *et al* 2010).

Banyaknya jenis pembagian, klasifikasi, pola kepekaan dan penemuan antibiotik baru seringkali menyulitkan klinisi dalam menentukan pilihan antibiotika yang tepat ketika menangani suatu kasus. Hal ini merupakan salah satu faktor pemicu terjadinya salah satu resisten (Peterson 2005). Adanya resisten terhadap antibiotika mendorong dilakukannya penelitian untuk mencari alternatif lain yang

lebih aman, misalnya penggunaan tanaman yang memiliki potensi sebagai antibakteri.

Pemanfaatan *herbal medicine* kini ramai dibicarakan, termasuk manfaatnya namun kebanyakan informasi yang ada hanya sebatas bukti empiris belum ada bukti ilmiah. Tanaman obat merupakan sumber bahan obat tradisional yang digunakan secara turun-temurun dimana salah satu manfaat tanaman obat adalah sebagai zat antibakteri. Penggunaan bahan alam sebagai obat tradisional telah dilakukan sejak berabad-abad yang lalu. Penggunaan obat tradisional secara umum dinilai lebih aman dari pada penggunaan obat modern, hal ini dikarenakan obat tradisional memiliki efek samping yang relatif sedikit dari pada obat modern (Juliantina 2008).

Indonesia kaya akan tanaman alam sebagai obat tradisional, diantaranya adalah tanaman daun ashitaba (*angelica keiskei*), Ashitaba (*Angelica keiskei*) adalah salah satu jenis tanaman obat, merupakan tanaman introduksi yang belum banyak dikenal di Indonesia sedangkan di Jepang tanaman ashitaba dikonsumsi sebagai sayuran yang populer di Jepang, berpotensi sebagai antibakteri, antijamur, antitumor, antiinflamasi (Bove 2013).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Suhartati dan Virgianti 2015) membuktikan bahwa ekstrak etanol daun ashitaba (*Angelica keiskei*) memiliki perbedaan daya hambat terhadap bakteri *staphylococcus aureus*. n-heksana merupakan pelarut non polar digunakan untuk menyari senyawa seperti minyak atsiri, terpenoid, triterpenoid, sterol lemak, dan asam lemak, alkaloid, karotenoid, klorofil dan resin (Depkes 2005). Etil asetat bersifat semi polar sebagai pelarut

karena dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, dan tannin (Putri dkk. 2013). Air adalah pelarut yang sangat polar digunakan untuk menyari seperti antosianin, tanin, saponin, glikosida dan gula (Depkes 2005).

L. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori yang ada, maka dapat disusun suatu hipotesis dalam penelitian ini yaitu :

Ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun ashitaba (*Angelica keiskei*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* (ATCC 19430).

Ekstrak etanol, fraksi n-Heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun ashitaba (*Angelica keiskei*) mempunyai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

Ekstrak etanol dan ketiga fraksi daun ashitaba (*Angelica keiskei*) tersebut terdapat fraksi yang memiliki pengaruh antibakteri yang lebih efektif terhadap bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 19430 yaitu fraksi etil asetat.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ashitaba yang diperoleh dari Trawas, Mojokerto, Jawa Timur.

Sampel daun merupakan simplisia nabati daun ashitaba diambil bagian daun yang masih muda, berwarna hijau, diambil dari tanaman yang masih segar, terbebas dari hama di daerah Trawas, Mojokerto, Jawa Timur.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah uji aktivitas antibakteri, ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun ashitaba.

Variabel utama kedua adalah *Salmonella typhi* ATCC 19430.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang biasa diubah-ubah yang dimaksudkan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah berbagai variasi

konsentrasi dari ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun ashitaba.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya, hasil yang didapatkan tidak menyebar dan dapat dilakukan peneliti lain secara tepat. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 19430, kondisi laboratorium (meliputi: kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, waktu panen, pemilihan daun, dan metode ekstraksi.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan *Salmonella typhi* ATCC 19430 yang dipengaruhi oleh ekstrak etanol fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dari daun ashitaba.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sashitaba adalah daun dari tanaman ashitaba yang diambil dari daerah Trawas, Mojokerto, Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun ashitaba, yaitu serbuk yang diperoleh dari daun ashitaba yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir dimaksudkan agar kotoran yang menempel dapat hilang, dikeringkan dengan oven suhu 50°C, selanjutnya diblender dan diayak dengan pengayak nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun ashitaba adalah hasil ekstraksi serbuk daun ashitaba dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% lalu dipekatkan dengan evaporator.

Keempat, fraksi n-heksana adalah ekstrak daun ashitaba yang ditambah pelarut air kemudian difraksinasi dengan pelarut n-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat daun ashitaba adalah hasil fraksinasi dari residu n-heksana dengan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air daun ashitaba adalah residu dari hasil fraksinasi ekstrak etil asetat daun ashitaba dengan menggunakan air sebagai pelarut polar.

Ketujuh, bakteri uji dari penelitian ini adalah *Salmonella typhi* ATCC 19430.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri adalah kemampuan dari daun ashitaba (*Angelica keiskei*.) dalam membunuh bakteri ditentukan dengan metode dilusi yaitu berupa seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625; 0,313%; 0,156%; 0,078% kontrol (+); (-) kontrol negatif adalah suspensi bakteri dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI), kontrol pembandingan adalah suspensi bakteri yang ditambah antibiotik dengan seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan penelitian adalah daun ashitaba (*Angelica keiskei*) yang segar, bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430, etanol 96%, SSA (*Salmonella, shigella* Agar), *Brain Heart Infusion* (BHI), aquadestilata, HCl, FeCl₃ 1%, larutan mayer, larutan Dragendrof, kalium tellurite, hidrogen

peroksida, asetat, anhidrida, asam sulfat pekat, asam asetat, cat kristal violet, larutan lugol, iodine, safranin.

2. Alat.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, ayakan, oven, *moisture balance*, botol maserasi, tabung reaksi steril, cawan petri steril, kapas lidi steril, jarum ose, autoklaf, inkas, inkubator, lampu spirtus, corong kaca, labu destilasi, kertas saring.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama dalam penelitian ini adalah melakukan identifikasi tumbuhan ashitaba di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Sebelas Maret. Identifikasi ini bertujuan untuk mencocokkan ciri makroskopis dan mikroskopis, selain itu juga berfungsi untuk mencocokkan ciri morfologi yang ada pada daun ashitaba (*Angelica keiskei* [Miq.] koidz).

2. Pengeringan bahan dan pembuatan serbuk daun ashitaba

Daun ashitaba yang sudah disortasi basah, dicuci bersih dengan air mengalir, dikeringkan dioven selama 2-3 hari yang bertujuan untuk mengurangi kadar air untuk mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Simplisia yang telah kering dihaluskan kemudian diayak dengan menggunakan ayakan no.40.

3. Penetapan kadar lembab

Serbuk daun ashitaba dilakukan penetapan kadar lembab dengan cara serbuk daun ashitaba ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian diukur kadar lembab

serbuk dengan menggunakan alat *moisture balance*, serbuk daun ashitaba hasil pengeringan kemudian ditimbang dan dihitung kadar lembabnya dengan persyaratan tidak lebih dari 10%.

4. Identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun ashitaba

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk mengetahui kandungan kimia yang terkandung dalam serbuk daun ashitaba. Identifikasi senyawa flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, terpenoid. dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

4.1. Flavonoid Uji flavonoid pada ekstrak daun ashitaba dilakukan dengan cara menimbang 2 mg ekstrak daun ashitaba dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air panas, ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg, 2 ml larutan alkohol : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol, kemudian dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Reaksi positif bila dibandingkan dengan larutan standart yang jernih akan menunjukkan dengan adanya warna merah/kuning/jingga pada amil alkohol (Depkes 1978)

4.2. Saponin. Ekstrak daun ashitaba ditimbang sebanyak 0,5 gram dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan air panas 10 ml, didinginkan lalu dikocok kuat-kuat selama 10 menit. Bila di bandingkan dengan larutan standart reaksi positif akan terbentuk buih yang mantab setinggi 1 sampai 10 cm. Dan pada penambahan setetes asam klorida 2N buih tidak hilang(Depkes 1978)

4.3. Tanin. Serbuk simplisia daun ashitaba ditambah 10 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit dan saring. Filtrat yang diperoleh disebut

larutan B. Sebanyak 5 ml larutan B ditambah besi (III) klorida 1%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat dan biru kehitaman (Robinson 1995)

4.4. Alkaloid. Ekstrak daun ashitaba ditimbang 500 mg dilarutkan dalam 100 ml air panas lalu dipanaskan selama 15 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh disebut larutan A. Dimasukkan larutan A sebanyak 5 ml dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan 1,5 ml asam klorida 2%, larutan dibagi kedalam 3 tabung dan masing-masing sama banyak. Tabung reaksi yang pertama untuk pembandingan, tabung reaksi kedua ditambah 2 tetes reagent dragendorf, reaksi positif ditunjukkan adanya keruhan atau endapan coklat, tabung reaksi ketiga ditambah 2-4 tetes mayer, reaksi positif ditunjukkan adanya endapan putih kekuningan (Depkes 1978)

4.5 Terpenoid. Identifikasi terpenoid. Sebanyak 1 g serbuk daun ashitaba ditimbang lalu ditambah kloroform sebanyak 20 tetes, setelah itu dikocok. Masing-masing asetat anhidrat dan asam sulfat pekat sebanyak 2 tetes ditambahkan pada filtrat. Reaksi positif ditunjukkan dengan memberikan warna merah atau ungu (Harborne, 1996).

5. Pembuatan ekstrak daun ashitaba secara maserasi

Serbuk daun ashitaba ditimbang sebanyak 500 gram ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan (1:10) sebanyak 5 liter. Proses maserasi dilakukan dalam keadaan tertutup menggunakan wadah gelap dan terhindar dari sinar matahari langsung. Maserat yang diperoleh disaring, Kemudian maserat hasil maserasi dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai didapat ekstrak kental (Voigt 1995).

6. Uji bebas etanol

Ekstrak yang telah pekat diuji sudah bebas etanol atau belum dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol. Tujuan dilakukannya tes bebas etanol ini bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri.

7. Penetapan persen rendemen

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

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

8. Fraksinasi

Pembuatan fraksi n-heksana, etil asetat dan air dilakukan dengan cara diambil ekstrak etanol yang sudah didapatkan kemudian didispersikan dengan air-etanol dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian difraksinasi dengan n-Heksana. Fraksinasi n-Heksana dilakukan sebanyak tiga kali. Sari yang didapat dari fraksinasi n-heksana dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Hasil fraksinasi ini disebut fraksi n-heksana.

Lapisan sisa fraksinasi n-heksana kemudian ditambah dengan etil asetat. Fraksinasi etil asetat sebanyak tiga kali. Hasil yang didapat dari fraksinasi etil asetat dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Hasil fraksi ini disebut fraksi etil asetat

Sisa hasil fraksinasi n-heksana dan etil asetat kemudian dipekatkan dengan cara diuapkan di atas penangas air, hasilnya disebut fraksi air.

9. Pembuatan suspensi mikroorganisme uji

Bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430 dalam biakan murni diambil 1 ose steril kemudian dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril yang sudah berisi 5ml BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, selanjutnya digunakan untuk identifikasi (Bonang & Koeswardono 1982)

10. Identifikasi bakteri uji

Pertama, dengan metode cawan gores. Bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 19430 dalam biakan murni diambil satu ose kemudian dimasukkan tabung yang berisi *Brain Heart Infusion* (BHI), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Bonang & Koeswardono 1982). Identifikasi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 19430, biakan *Salmonella typhi* ATCC 19430 diinokulasi secara perataan pada media *Salmonella, shigella Agar* (SSA), diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C.

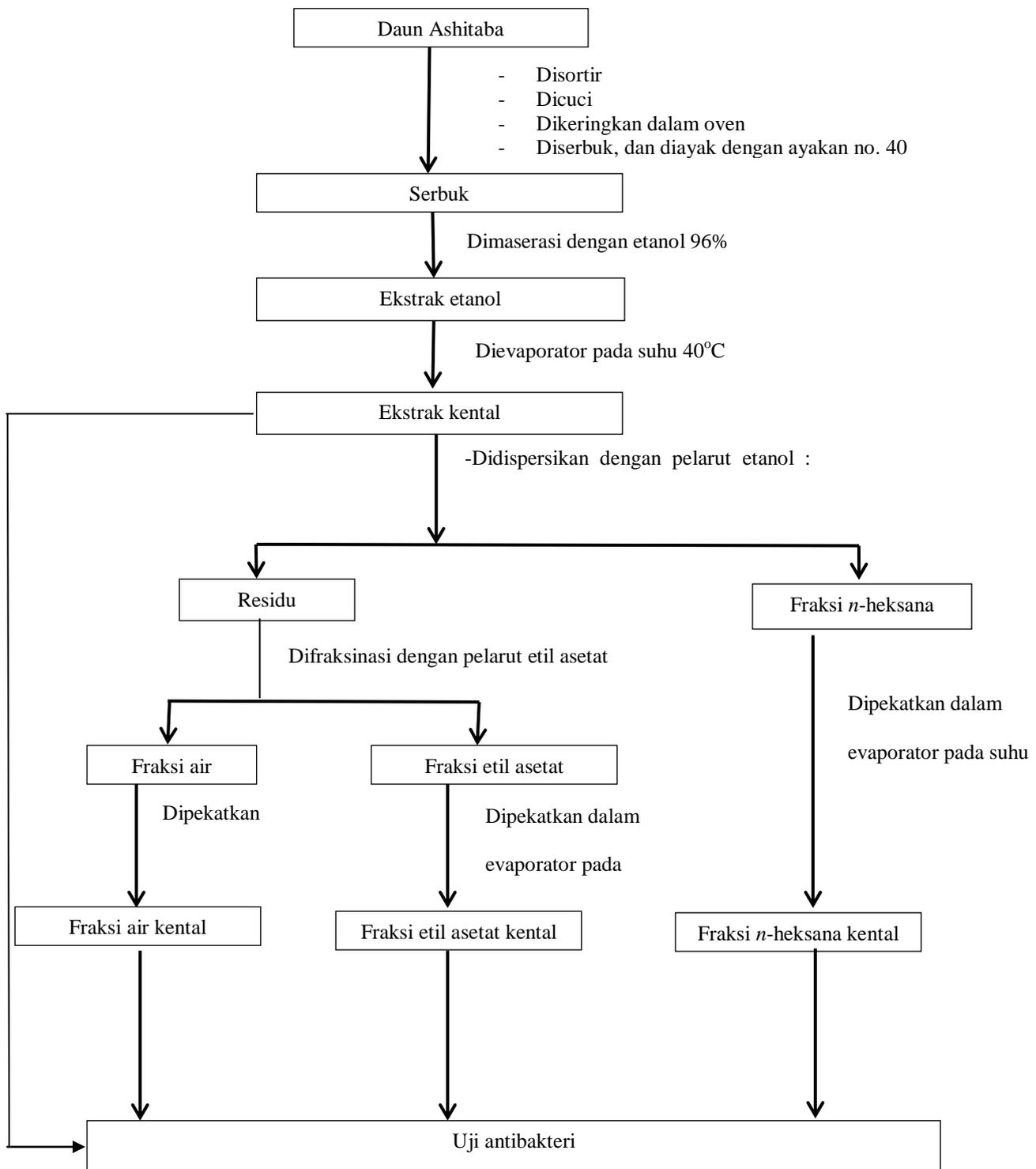
Identifikasi berdasarkan uji biokimia, medium yang digunakan yaitu SIM, KIA, LIA dan Citrat. Media SIM (*Sulfida Indol Motility*) untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri. Media KIA (*Kliger Iron Agar*) untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dan sulfide. Media LIA (*Lysine Iron Agar*) untuk menguji diaminasi lisin dan media Citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrate sebagai sumber karbon tunggal. Bakteri uji diinokulasi secara goresan dan tusukan pada media KIA dan

LIA, goresan pada media citrat, tusukan pada media SIM, kemudian diinokulasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Jawetz *et al.* 1986).

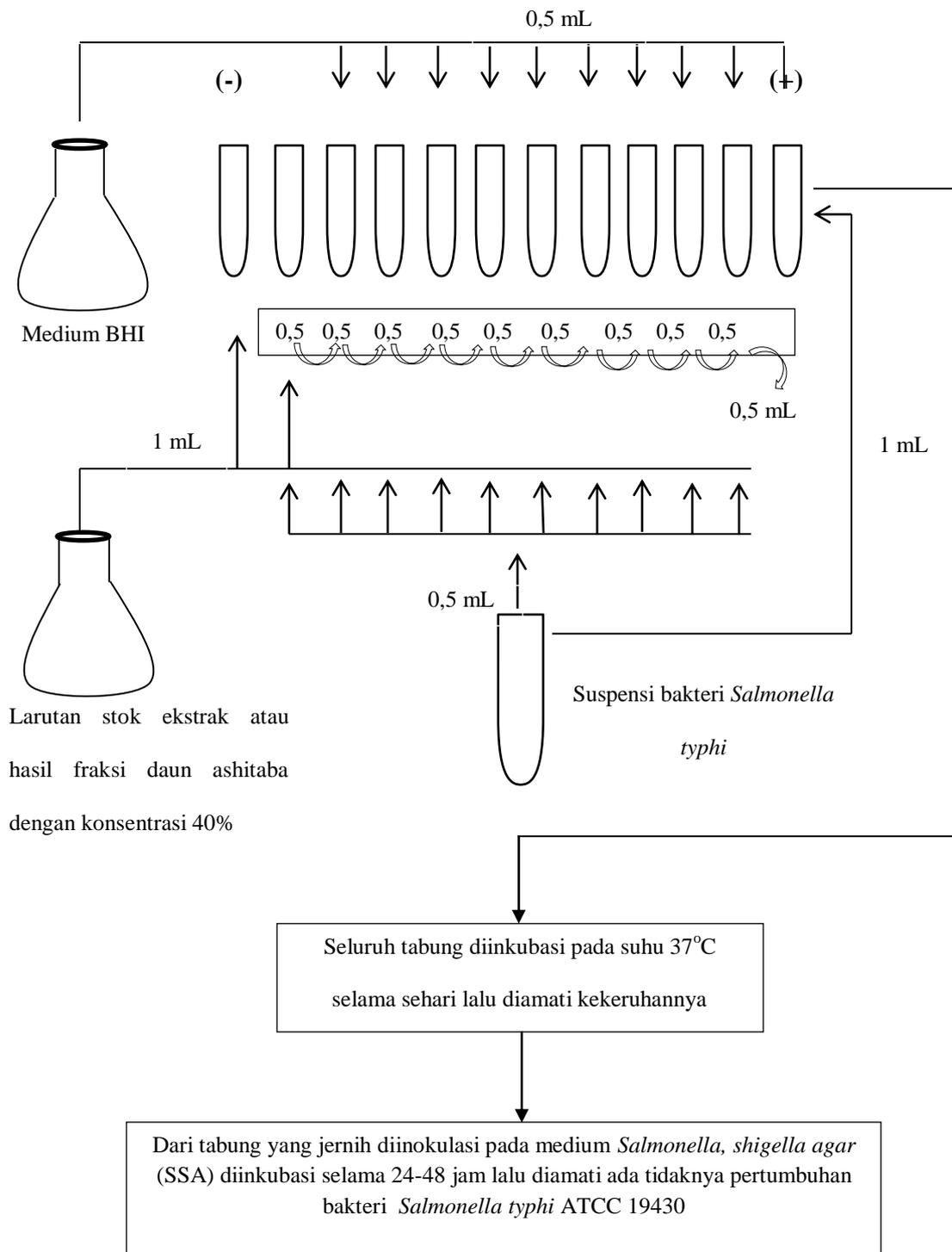
11. Pengujian daya antibakteri

Hasil ekstrak etanolik, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksana daun ashitaba (*Angelia keskei*) yang diperoleh diuji secara mikrobiologi dengan bakteri *Salmonella Typhi* ATCC 19430. Pengujian daya antibakteri dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi dengan metode dilusi untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 12 tabung steril dengan konsentrasi 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625; 0,313%; 0,156%; 0,078% Kontrol positif (+); kontrol negatif (-). Konsentrasi larutan stock ekstrak adalah 20000 ppm. Masukkan 0,5 ml media BHI dari tabung 3 sampai 11, secara aseptik, ke dalam tabung 1 ditambahkan 1,0 ml larutan stock ekstrak yang akan diperiksa, kemudian dari tabung 2 dan 3 dimasukkan ke dalam 0,5 ml larutan stock, kemudian dari tabung 3 dipipet 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung 4 begitu seterusnya sampai tabung 11 kemudian dibuang, tambahkan 0,5 ml biakan yang akan diperiksa yang telah diencerkan 1:1000 dari biakan yang telah dieramkan dari tabung 2 sampai tabung 11. Tabung terakhir berlaku sebagai kontrol positif. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan menggoreskan larutan dari sejumlah tabung yang hasilnya jernih pada medium selektif kemudian diinkubasi 37⁰C selama 24 jam dan diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri maka merupakan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dari goresan bakteri yang sudah tidak terdapat pertumbuhan bakteri (Bonang & Koeswardono 1982).



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun ashitaba (*Angelica keiskei*).



Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri fraksi *n*-Heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun ashitaba terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430 dengan metode dilusi.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian Daun Ashitaba

1. Hasil determinasi tanaman ashitaba (*Angelica keiskei* [Miq.] koidz)

Determinasi tanaman ashitaba dilakukan di Fakultas MIPA Laboratorium Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta. Berdasarkan hasil determinasi diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar tanaman ashitaba. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan digunakan untuk penelitian dengan cara mencocokkan ciri-ciri tanaman yang tercantum dalam literatur, untuk menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan dan menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain.

Berdasarkan hasil determinasi dengan keterangan surat No : 34/UN27.9.6.4/Lab/2016 dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ashitaba (*Angelica keiskei* [Miq.] koidz). Surat keterangan hasil determinasi daun ashitaba dapat dilihat dalam lampiran 1.

2. Pengambilan sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman ashitaba yang diperoleh dari daerah Trawas, Mojokerto, Jawa Timur pada bulan Desember 2015

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ashitaba yang diambil secara acak dari daerah Trawas, Mojokerto, Jawa Timur.

3. Pembuatan serbuk daun ashitaba

Daun ashitaba yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir sampai terbebas dari kotoran. Daun ashitaba dikeringkan dengan oven 50°C. Proses pengeringan dimaksudkan mengurangi kadar air untuk mencegah terjadinya pembusukkan yang disebabkan oleh jamur dan bakteri, mencegah terjadinya reaksi enzimatik yang dapat menurunkan mutu serbuk, dan mempermudah untuk pembuatan serbuk.

Daun ashitaba yang sudah dikeringkan kemudian dibuat serbuk dengan tujuan untuk memperkecil partikel yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung efektif. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah daun ashitaba dapat dilihat pada tabel 1. Pengeringan daun ashitaba dilakukan sebanyak 7.000 gram bobot basah kemudian dikeringkan dan didapat bobot kering 2.000 gram, diperoleh rendemen bobot kering terhadap bobot basah adalah 28,57% b/b.

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun ashitaba

Bobot Basah	Bobot Kering	Rendemen
7.000 gram	2.000 gram	28,57%

4. Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun ashitaba

Penetapan kadar lembab daun ashitaba menggunakan *Moisture Balance*.

Hasil penetapan kadar lembab dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun ashitaba

No	Bobot serbuk (g)	Kadar lembab (%)
1	2	5,9
2	2	5,3
3	2	3,5
	Rata-rata	4,9

Hasil penetapan kadar lembab daun ashitaba didapatkan rata-rata sebesar 4,9%. Kadar lembab memenuhi syarat dimana serbuk tidak boleh lebih dari 10% karena dengan kadar lembab kurang dari 10% sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tidak tumbuh sehingga bahan lebih awet (Katno dkk. 2008).

5. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun ashitaba

Metode pembuatan ekstrak pada penelitian ini dengan menggunakan cara maserasi, Cairan penyari yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan etanol 96%. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, kurkumin, antraknon, flavonoid, steroid, dan klorofil (Depkes 1986), etanol juga dapat menghambat kerja enzim sehingga terhindar dari proses hidrolisis dan oksidasi (Voigt 1995).

Serbuk daun ashitaba ditimbang sebanyak 500 gram ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan (1:10) sebanyak 5 liter. Proses maserasi dilakukan dalam keadaan tertutup menggunakan wadah gelap dan terhindar dari sinar matahari langsung. Maserat yang diperoleh disaring, kemudian dipekatkan dengan evaporator sampai diperoleh maserat yang pekat. Data hasil pembuatan ekstrak etanol daun ashitaba dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Rendemen ekstrak etanol daun ashitaba

Serbuk (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%)
500	42,49	8,49

Perhitungan persen rendemen ekstrak etanol daun ashitaba dapat dilihat di lampiran 12.

6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol daun ashitaba

Serbuk dan ekstrak etanol daun ashitaba yang didapat diuji kandungan kimia yang terkandung, untuk membuktikan kebenarannya diuji sebagai berikut:

Tabel 4. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun ashitaba secara kualitatif

Senyawa	Pustaka	Interpretasi hasil	
		Serbuk	Ekstrak
Saponin	Reaksi positif bila busa masih terbentuk selama 30 menit setelah penetesan HCl 2 N.	+	+
		(ada buih)	(ada buih)
Alkaloid	Terbentuk endapan coklat pada reagen Dragendorff dan terbentuk endapan putih kekuningan pada reagen Meyer.	+	+
		(putih kekuningan)	ekuningan)
Tanin	Reaksi positif bila menjadi warna coklat kehijauan atau biru kehitaman.	+	+
		(hitam)	(hitam)
Flavonoid	Reaksi positif bila dibandingkan dengan larutan standart yang jernih akan menunjukkan dengan adanya warna merah/kuning/jingga pada amil alkohol.	+	+
		(kuning)	(jingga pada amil alkohol)
Terpenoid	Reaksi positif bila terbentuk warna merah atau ungu.	+	+
		(ungu)	(ungu)

Keterangan : + : ada senyawa
- : tidak ada senyawa

Identifikasi kandungan kimia terhadap serbuk dan ekstrak etanol daun ashitaba dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam daun ashitaba dengan menggunakan tabung reaksi. Berdasarkan tabel 4 dapat dilihat bahwa hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol daun ashitaba positif mengandung saponin, alkaloid, tanin, flavonoid dan terpenoid, dimana senyawa tersebut diduga memiliki aktivitas antibakteri.

7. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun ashitaba

Ekstrak etanol daun ashitaba yang telah pekat diuji sudah bebas etanol atau belum dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun ashitaba positif bebas etanol karena tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 1978). Tujuan dilakukan uji bebas etanol pada ekstrak daun ashitaba adalah untuk mencegah terjadinya aktivitas antibakteri dari etanol pada uji aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* karena etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian ini.

8. Hasil fraksinasi ekstrak daun ashitaba

Fraksinasi adalah suatu cara untuk memisahkan golongan utama kandungan satu dari golongan utama lainnya berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan terjadi fraksi yang berbeda-beda. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar antara lain antosianin, tanin, saponin, glikosida dan gula, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar seperti minyak atsiri, terpenoid, triterpenoid, alkaloid, klorofil dan resin dan senyawa semi polar akan masuk ke pelarut semi polar seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan tannin. Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya dilakukan proses fraksinasi cair-cair.

Pelarut non polar yang digunakan adalah *n*-heksana dan pelarut semi polar yang digunakan etil asetat sedangkan pelarut polar yang digunakan adalah air. Hasil penyarian dari ketiga pelarut tersebut yang akan digunakan dalam

penelitian. Perhitungan persen rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun ashitaba dapat dilihat pada lampiran 12. Data hasil pembuatan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun ashitaba dilihat pada tabel berikut.

8.1. Fraksi *n*-heksana. Rendemen hasil fraksi *n*-heksana dapat dilihat dalam tabel 5.

Tabel 5. Persentase rendemen hasil fraksi *n*-heksana daun ashitaba

Bobot ekstrak etanol	Bobot fraksi	Rendemen
(g)	(g)	(%)
20	4,21	21,05

Berdasarkan tabel 5 dapat dilihat bahwa perhitungan prosentase rata-rata rendemen fraksi *n*-heksana daun ashitaba didapat 21,05%. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksana daun ashitaba selengkapnya dapat dilihat dalam lampiran 12.

8.2. Fraksi etil asetat. Rendemen hasil fraksinasi fraksi etil asetat dapat dilihat dalam tabel 6.

Tabel 6. Persentase rendemen hasil fraksi etil asetat daun ashitaba

Bobot ekstrak etanol	Bobot fraksi	Rendemen
(g)	(g)	(%)
20	2,25	11,25

Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat bahwa perhitungan persentase rata-rata rendemen fraksi etil asetat daun ashitaba didapat 11,25%. Hasil perhitungan rendemen fraksi etil asetat daun ashitaba selengkapnya dapat dilihat dalam lampiran 12.

8.3. Fraksi air. Residu yang didapat dari fraksi etil asetat adalah fraksi air yang kemudian dipekatkan pada *waterbath* dengan didapatkan fraksi air yang kental.

Rendemen hasil fraksinasi fraksi air dapat dilihat dalam tabel 7.

Tabel 7. Persentase rendemen hasil fraksi air daun ashitaba

Bobot ekstrak etanol (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
20	6,22	31,10

Berdasarkan tabel 7 dapat dilihat bahwa perhitungan persentase rata-rata rendemen fraksi air daun ashitaba didapat 31,1%. Hasil perhitungan rendemen fraksi air daun ashitaba selengkapnya dapat dilihat dalam lampiran 12.

Hasil fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibandingkan fraksi yang lain karena sebagian besar senyawa yang terkandung dalam daun ashitaba bersifat polar. Rendemen dari hasil setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun ashitaba berbeda. Hasil rendemen yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu 100%. Hal tersebut disebabkan ekstrak banyak yang menempel pada wadah timbangan dan corong pisah, serta kurangnya kekentalan ekstrak untuk proses fraksinasi.

9. Hasil identifikasi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 19430

Hasil identifikasi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430 diinokulasi pada media *Bismuth Sulfite Agar* (BSA) dengan ose steril dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, maka penampakan koloninya berwarna hitam dan sekelilingnya terdapat endapan coklat dengan berbintik hitam seperti mata ikan. Endapan

tersebut dikarenakan adanya pembentukan H_2S dan bereaksi dengan ion bismuth yang terdapat dalam media tersebut

Uji identifikasi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430 secara mikroskopis. Hasil pengamatan secara mikroskopis dengan metode pewarnaan Gram perbesaran kuat (100x) akan tampak berwarna merah, berbentuk batang dan bergerombol.

Uji identifikasi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430 secara biokimia. Uji biokimia dilakukan pada media SIM, LIA, KIA, dan Sitrat. Uji pada media SIM, digunakan untuk mengetahui sulfida, indol, motil. Bakteri *salmonella typhi* pada uji media SIM di dapatkan hasil Sulfida(+) karena adanya warna hitam pada media SIM disebabkan oleh adanya pembentukan H_2S

Uji pada KIA, bakteri *salmonella typhi* pada media KIA terbentuk reaksi biokimia K/A^{S+} yang artinya pada dasar (butt) media berwarna kuning (bersifat asam) dan lereng (slant) berwarna merah (bersifat basa), karena *salmonella typhi* tidak menfermentasi semua karbohidrat sebab pada media KIA terdapat dua macam karbohidrat glukosa dan lactosa. Dan warna hitam yang terjadi dikarenakan *salmonella typhi* menfermentasi metionin dan sistein. Pada media KIA terdapat asam amino metionin dan sistein, jika bakteri memfermentasi kedua asam amino ini maka gugus S akan keluar dan gugus S akan bergabung dengan H_2O membentuk H_2S . Selanjutnya H_2S bergabung dengan Fe^{2+} membentuk FeS berwarna hitam dan mengendap

Uji pada media LIA, uji pada media LIA didapatkan hasil $K/K^{S(+)}$ yang artinya bakteri *salmonella typhi* membentuk H_2S karena terbentuk endapan hitam

pada bekas tusukan. Sedangkan warna media ungu (basa). Hal ini terjadi karena terjadi dekarboksilasi pada lisin (mampu memecah lisin).

Uji pada media Citrat, pada media Citrat *salmonella typhi* membentuk reaksi warna biru dikarenakan *salmonella typhi* menggunakan citrat sebagai salah satu/satu-satunya sumber karbon karena pada media Simons citrat berisi indikator BTB (*Brom Tymol Blue*).

Berdasarkan semua hasil identifikasi dapat disimpulkan bahwa bakteri yang digunakan benar-benar *Salmonella typhi* ATCC 19430.

10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430 secara dilusi

Hasil ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun ashitaba dilakukan pengujian aktivitas terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430 dengan metode dilusi. Konsentrasi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air adalah 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,313%; 0,156%; 0,078% dengan kontrol positif berupa bakteri uji dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kontrol negatif berupa ekstrak atau fraksi. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menunjukkan adanya daya antibakteri ekstrak atau fraksi yang dapat dilihat dari pengujian ekstrak atau fraksi terhadap bakteri uji pada tabung kemudian diinokulasikan pada media *Salmonella, shigella Agar* (SSA) dengan tidak atau adanya pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430 pada media SSA.

Tabel 8. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun ashitaba terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430

No.	Konsentrasi (% b/v)	Ekstrak etanol			Fraksi <i>n</i> -heksana			Fraksi etil asetat			Fraksi air		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	20	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
4	10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
5	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	2,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	1,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	0,625	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	0,313	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	0,156	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	0,078	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Kontrol (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan :

(-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : Ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-) : Larutan stok (ekstrak/fraksi)

Kontrol (+) : Suspensi bakteri

Penelitian ini diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air memiliki Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430. Fraksi *n*-heksana dan Fraksi air menunjukkan hasil Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada konsentrasi 40%, ekstrak etanol menunjukkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada konsentrasi 20% sedangkan fraksi etil asetat menunjukkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada konsentrasi 10%. Hasil penelitian dengan metode dilusi menunjukkan fraksi etil asetat lebih efektif dengan Konsentrasi Bunuh Minimum 10% dibandingkan dengan ekstrak, fraksi *n*-heksana, dan fraksi air dalam membunuh bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430. Hal ini berkaitan dengan kandungan senyawa kimia dari ekstrak daun ashitaba yang kemungkinan dapat ditarik oleh fraksi etil asetat antara lain alkaloid, tannin dan flavonoid. Fraksi air dan *n*-heksana memiliki daya bunuh yang rendah terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430 karena

hanya dapat menarik senyawa-senyawa kimia tertentu dari daun ashitaba berdasarkan kepolarannya. Alkaloid bersifat antimikroba spektrum luas. Menurut Juliantina dkk. (2008) mekanisme alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Ajizah (2004) menyatakan bahwa tanin dapat berikatan dengan dinding sel mikroorganisme dan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim. Flavonoid memiliki kemampuan membentuk kompleks dengan protein sel bakteri melalui ikatan hidrogen. Struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri yang mengandung protein menjadi tidak stabil karena struktur protein sel bakteri menjadi rusak karena adanya ikatan hidrogen dengan flavonoid, sehingga protein bakteri menjadi kehilangan aktivitas biologisnya, akibatnya fungsi permeabilitas sel bakteri terganggu dan sel bakteri menjadi pecah yang berakibat pada kematian sel bakteri (Kusdarwati *et al* 2010).

Penelitian ini menggunakan metode dilusi atau uji seri pengenceran. Metode ini bermanfaat untuk mengetahui dosis minimal dari obat yang bersifat bakteristatik dan bakterisid. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dapat diketahui dari konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri uji pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA).

11. Hasil pengujian daya antibakteri antibiotik kotrimoksazol

Penelitian ini menggunakan kotrimoksazol sebagai pembanding pengujian aktivitas antibakteri. Hasil inokulasi kotrimoksazol terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430 dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Hasil uji aktivitas antibakteri kotrimoksazol terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430

No.	Konsentrasi (%)	Antibiotik Kotrimoksazol		
		I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	4.8	-	-	-
3	2.4	-	-	-
4	1.2	-	-	-
5	0.6	+	+	+
6	0,3	+	+	+
7	0,15	+	+	+
8	0,075	+	+	+
9	0,0375	+	+	+
10	0,01875	+	+	+
11	0,00937	+	+	+
12	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :

- (-) : Tidak ada pertumbuhan bakteri
 (+) : Ada pertumbuhan bakteri
 Kontrol (-) : Berisi antibiotik cotrimoksazol
 Kontrol (+) : Berisi suspensi bakteri

Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) kotrimoksazol terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430 adalah 1,2%. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terbaik adalah fraksi etil asetat yaitu pada konsentrasi 10%. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas kotrimoksazol dalam membunuh *Salmonella typhi* ATCC 19430 lebih efektif dibanding dengan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun ashitaba. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun ashitaba terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430 lebih rendah daripada Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) kotrimoksazol. Penggunaan obat kotrimoksazol di masyarakat belum dapat digantikan dengan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari dau ashitaba karena konsentrasi sebagai antibakteri masih terlalu besar terhadap *Salmonella typhi* dibandingkan dengan kotrimoksazol.

12. Hasil identifikasi fraksi daun ashitaba

Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun ashitaba dapat dilihat pada tabel 10.

Senyawa	Interpretasi hasil fraksi			Keterangan		
	<i>n</i> -Heksana	Etil asetat	Air	<i>n</i> -Heksana	Etil asetat	Air
Saponin	Tidak ada buih	Tidak ada buih	Ada buih	-	-	+
Alkaloid	Putih kekuningan	Endapan coklat	Hitam	+	+	-
Tanin	hijau	Coklat kehitaman	Hitam	-	+	+
Flavonoid	coklat	merah	Kuning	-	+	+
Terpenoid	Merah bata	coklat	Hitam	+	-	-

Tabel 10. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun ashitaba

Keterangan :
 + : ada senyawa
 - : tidak ada senyawa

Berdasarkan hasil identifikasi tersebut disimpulkan bahwa fraksi *n*-heksana terdapat senyawa alkaloid dan terpenoid yang menunjukkan hasil positif. Sedangkan fraksi etil asetat menunjukkan hasil positif pada senyawa alkaloid,

flavonoid, dan tanin. Fraksi air menunjukkan hasil positif pada senyawa saponin, tanin dan flavonoid.

Hasil uji dilusi menunjukkan bahwa ketiga fraksi memiliki aktivitas antibakteri tetapi hanya fraksi etil asetat yang efektif untuk membunuh bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430. Putri dkk. (2013) menyebutkan bahwa etil asetat dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan polifenol. Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun ashitaba memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi 10% terhadap bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430 karena terkandung senyawa kimia alkaloid, flavonoid dan tannin. Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri (Juliantina *et al.* 2008). Senyawa flavonoid memiliki kemampuan membentuk kompleks dengan protein sel bakteri melalui ikatan hidrogen. Struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri yang mengandung protein menjadi tidak stabil karena struktur protein sel bakteri menjadi rusak karena adanya ikatan hidrogen dengan flavonoid, sehingga protein bakteri menjadi kehilangan aktivitas biologisnya, akibatnya fungsi permeabilitas sel bakteri terganggu dan sel bakteri menjadi pecah yang berakibat pada kematian sel bakteri (Kusdarwati *et al* 2010). Ajizah (2004) menyatakan bahwa tanin dapat berikatan dengan dinding sel mikroorganisme dan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun ashitaba mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430.

Kedua, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun ashitaba sebagai antibakteri terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430 berturut-turut adalah 20%, 40%, 10% dan 40%.

Ketiga, fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun ashitaba tersebut memiliki aktivitas antibakteri paling efektif terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut aktivitas antibakteri daun ashitaba terhadap bakteri patogen lain.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut uji aktivitas secara *in vivo* terhadap fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun ashitaba.

DAFTAR PUSTAKA

- [Departemen Kesehatan RI]. 1978. *Material Medika Indonesia Jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Departemen Kesehatan RI]. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 7.
- [Departemen Kesehatan RI]. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 10.
- [Departemen kesehatan RI]. 1987. *Analisis Obat Tradisional*. Jilid I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 44-48.
- [DEPKES RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 3-11.
- [DEPKES RI]. 2005. *Materia Medika Indonesia. Jilid III*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 301-304.
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella Typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun *Psidium Guajava L*. *Jurnal Biologi Pertanian* 1: 31-8.
- Akhyar. 2010. Uji Daya Hambat dan Analisis KLT Bioautografi Ekstrak Akar dan Buah Bakau (*rhizophora stylosa griff.*) Terhadap *Vibrio harveyii* [Skripsi]. Makasar: Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin Makassar.
- Ansel HC. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Ed ke-4. Jakarta: Universitas Indonesia. Hlm 60-65
- Bakung CT. 2014. Studi Penggunaan Antibiotik pada Pasien ISPA Rawat Jalan di Rumah Sakit Profesor dr Aloe Saboe Kota Gorontalo [Thesis]. Universitas Negeri Gorontalo.
- Bridson EY.1998. *Oxoid The Manual 8th Edition* . hlm 134-136,247-256.
- Bonang G, Koeswardono E.S. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan klinik. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Katholik Indonesia Atmajaya*. Hlm 9,77-78,176-191
- Bove,F. Ashitaba :Tomorrow's Leaf Today.<http://modernfarmer.com/2013/04.ashitaba-tomorrows-leaf-today/>diakses tanggal 24 Maret 2016

- Br.Sembiring Bagem dan feri manoi. 2011. *Identifikasi Mutu Tanaman Ashitaba*. Balai penelitian tanaman obat dan aromatik, Bogor.
- Dalimartha S. 2008. *Taman Obat Indonesia*. Jakarta: Dinamika Media. hlm 425-427
- Dwijoseputro D. 1989. *Dasar-Dasar Mikrobiologi* Fakultas Pertanian Brawijaya. Malang: Djembatan.
- Ganiswara SG. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. hlm 569-573, 571-575.
- Gunawan, D. dan Mulyani, S., 2004, *Farmakognosi*, penebar Swadaya, Jakarta, hlm 106.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerjemah; Patmawinata K, Soediro I, Bandung: Penerbit ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.
- Harborne, J. B. 1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. penerjemah Kokasih, P. & Iwang, S. Bandung : Penerbit ITB.
- Harminta, 2004. *Analisa Hayati*. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA .1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan* edisi 14. Bonang G, Penerjemah; Jakarta: Atma Jaya. Terjemahan dari: *Review of Medical Microbiology*.
- Juliantina F., Dewa A. C. M., Bunga N., Titis N., Endrawati T. B., 2008. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 60:58-62.
- Kusdarwati R, Sari L, Taufiq AM. 2010. Antibacterial effort of adas fruits (*Foeniculum vulgare*) extract on *Micrococcus luteus* bacterial by in vitro. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* . 2 (1) : 31-35.
- Lenny S. 2006. *Senyawa Flavonoid, Fenilpropanoida dan Alkaloida*. Medan : fakultas MIPA. Universitas Sumatera Utara.
- Markham K.M.1988. *Tecniques of Flavonoid Identification*. Diterjemahkan oleh Kosasi Patmawinata. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Ochiai LR. 2008. A Study of Typhoid Fever in Five Asian Countries: Disease Burden and Implications for Controls. *Bulletin of the World Health Organization*.

- Pelczar, M.J. and Chan, E.G.S., 1986, *Dasar-dasar Mikrobiologi Diterjemahkan Hadioentomo, R.S., Imas tejo, Tjitrosomo. S., Angka. S.L.*, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta, 107-17
- Peterson, L.R., 2005, Squeezing The Antibiotic Balloon: The Impact of Antimicrobial Classes on Emerging Resistance, *Evanston Northwestern Healthcare, The Feinberg School of Medicine at North western University, USA.*
- Praeparandi. 2006. *Card System Analisa Kimia Farmasi Kualitatif*. Bandung : Seksi Diktat Stenhl. Hlm 9.
- Pringgenies D. 2010. Karakteristik Senyawa Bioaktif Bakteri Symbion Moluska dengan GC-MS. *Jurnal Ilmu dan Tekhnologi Kelautan Tropis* 2:34-40.
- Pudiasuti, R,D. 2011. *Waspada penyakit pada anak*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Putri, W. S., Warditiani, N. K., Larasanty, L. P. F. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*). [Skripsi]. Fakultas Farmasi, Universitas Udayana, Bali.
- Radji dan Biomed.2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: ECG. hlm 130-136.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung : Institut Teknologi Bandung. hlm 77.
- Said A. 2007 *.Khasiat dan Manfaat Temulawak*. Jakarta: Sinar Widja Lestari. hlm 29
- Sidabutar, S., & Satari, H.I., 2010, Pilihan Terapi Empiris Demam Tifoid pada Anak, *Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran UI*, Jakarta, 11, 6, 434-9.
- Soepomo,1997,*Morfologi Tumbuhan* , yogyakarta : UGM - IKAPI
- Suhartati dan Virgianti. 2015. Daya Hambat Ekstra Etanol 70% Daun Ashitba (*Angelica keiskei*) Terhadap Bakteri *Stapylococcus aureus* yang diisolasi dari Luka Diabetes. Tasikmalaya. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada* Vol.14, No.1
- Sumarmo Poorwo S, Soedarmo, Garna Harry, Hadinegoro S Rejeki.2002. *Buku Ajar Ilmu Kesehatan Anak*. Jakarta: ikatan dokter anak indonesia FKUI.

- Sumastuti dan Sonlimar M. 2002. *Efek Sitotoksik Ekstrak Buah dan Daun Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa (scheff)Boerl.)* terhadap sel hela. *Media* 28 (12): 773-777
- Suriawiria, U., 1985, *Pengantar Mikrobiologi Umum*, Penerbit Angkasa, Bandung, 60-61, 57-58.
- Suryono DR Bambang. 1995. *Bakteriologi Umum dan Bakteriologi Klinik*. Kediri: AAK Bhakti Wiyata.
- Syarif, A., Setiawan, A., dan Muchtar, A.. 1995. *Farmakologi dan Terapi*, Edisi IV, Bagian Farmakologi, 514-526, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Tan, H.T., Kirana, R., 1986, *Obat-obat penting*, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hlm 231-24.
- Timotius, K.H., 1978, *Mikrobiologi Dasar*, Salatiga, Universitas Kristen Satya Wacana, hlm 39-42
- Voigt R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, penerjemah; Soendani Noerono Soewandi. Ed ke-5 Yogyakarta : Gadjah Mada University Press. hlm 512, 566, 571. Terjemahan dari: *Lehrbuch Der Pharmazeutischen Technologie*.
- Widyarto A. 2009. Uji Aktivitas 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

Lampiran 1. Surat keterangan hasil determinasi tanaman



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

Nomor : 34/UN27.9.6.4/Lab/2016
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -

Nama Pemesan : Mochamad Arif
NIM : 18123423A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Angelica keiskei* (Miq.) Koidz.
Familia : Apiaceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963; 1965) dan She *et al.* (2005) :

1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74b-631a

148. Apiaceae

82. *Angelica*

1b-4b-6b-8a-9b-53a-54b-57b-58b-59b-60b *Angelica keiskei* (Miq.) Koidz.

Deskripsi Tumbuhan :

Habitus : terna, menahun, tegak, tinggi bisa mencapai 0.5-1.5 m. Akar : tunggang, bercabang, bentuk cabang akar hampir silindris, putih kotor atau putih kekuningan atau coklat muda. Batang : tumbuh tegak, tidak berkayu, bersegi, beralur dalam, beruas, bercabang, permukaan gundul, berwarna hijau hingga hijau pucat. Daun : majemuk menyirip ganjil, anak daun 3 helai; helaian anak daun bulat telur, panjang 3.5-6 cm, lebar 4-5 cm, pangkal tumpul hingga membulat, ujung daun runcing, tepi daun bercangap menyirip hingga berbagi menyirip, tulang daun menyirip, permukaan atas hijau tua mengkilat, permukaan bawah hijau keputih-putihan, jika digerus aromatik; ibu tangkai daun bulat, hijau, gundul, panjang 7.5-10 cm; tangkai anak daun bulat, hijau, gundul, panjang 3.5-5 cm. Bunga : majemuk berbentuk payung, di ujung, dalam satu payung besar terdapat 20-25 bunga payung kecil, dengan panjang tangkai payung 2-4 cm, masing-masing bunga payung kecil bertangkai pendek, panjang 2-3 mm, masing-masing bunga payung dilindungi oleh daun pembalut (involukrum) berwarna hijau; kelopak bungaberbagi 5, berwarna hijau; mahkota berbagi 5, bagian pangkal berlekatan, warna putih kehijauan atau putih kekuningan; benang sari 5, berlepasan; tangkai putik pendek.

Surakarta, 22 Maret 2016

Kepala Lab. Program Studi Biologi

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

Penanggungjawab
Determinasi Tumbuhan

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

Mengetahui
Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS



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

Lampiran 2. Foto tanaman daun ashitaba dan serbuk daun ashitaba

(Angelica keiskei [Miq.] koidz)



Tanaman ashitaba (*Angelica keiskei* [Miq.] koidz)



Serbuk daun ashitaba (*Angelica keiskei* [Miq.] koidz)

Lampiran 3. Foto alat *Moisture Balance*, incubator, dan vortex



Moisture Balance



Vortex



Inkubator

Lampiran 4. Foto alat evaporator dan ekstrak etanol daun ashitaba



Evaporator



Ekstrak etanol daun ashitaba

Lampiran 5. Foto fraksinasi dan hasil fraksinasi daun ashitaba (*Angelica keiskei* [Miq.] koidz)



Fraksi air

Fraksi etil asetat

Fraksi *n*-heksana



f. n-Heksana

f. Etil asetat

f. Air

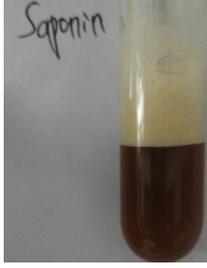
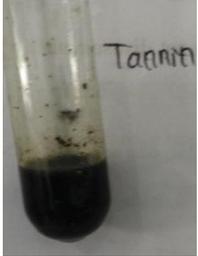
Fraksinasi ekstrak etanol daun ashitaba

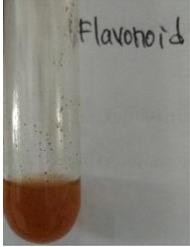
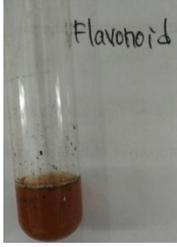
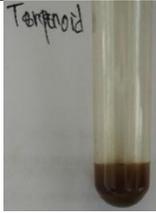
Lampiran 6. Foto identifikasi senyawa serbuk dan ekstrak daun ashitaba

Senyawa	Hasil	Hasil
	Serbuk	Ekstrak
Saponin		
Alkaloid		
Tanin		
Flavonoid		

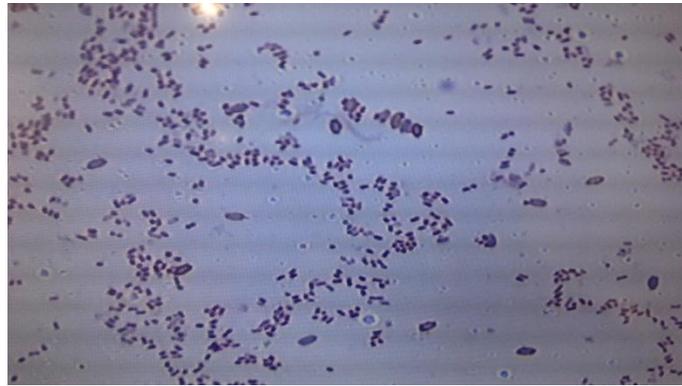
Terpenoid		
------------------	---	---

Lampiran 8. Foto identifikasi senyawa fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun ashitaba

Senyawa	Hasil Fraksi		
	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
Saponin			
Alkaloid			
Tanin			

Flavonoid			
Terpenoid			

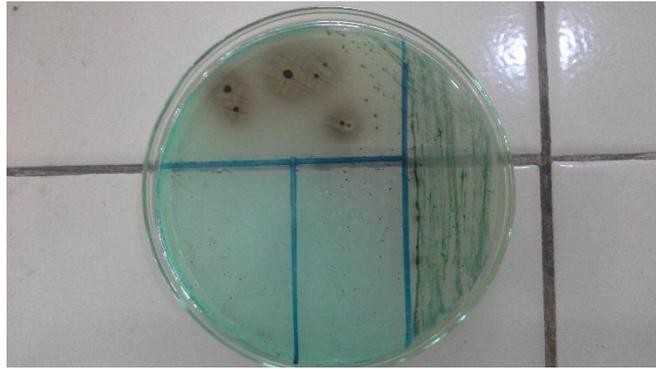
Lampiran 9. Foto hasil identifikasi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 19430



Pengamatan secara mikroskopis



Pengamatan secara Biokimia



Pengamatan secara Makroskopis

Lampiran 10. Hasil uji dilusi dan inokulasi ekstrak dan fraksi daun ashitaba terhadap *Salmonella typhi* ATCC 19430

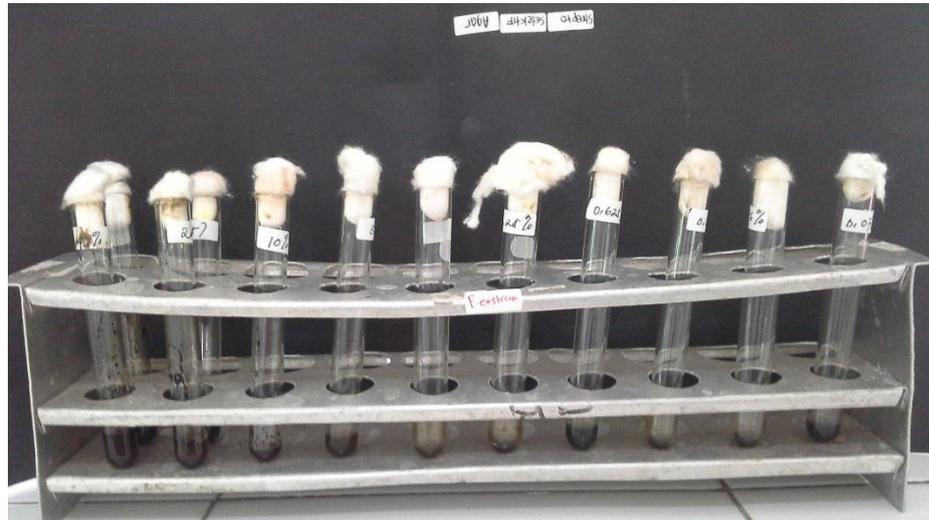
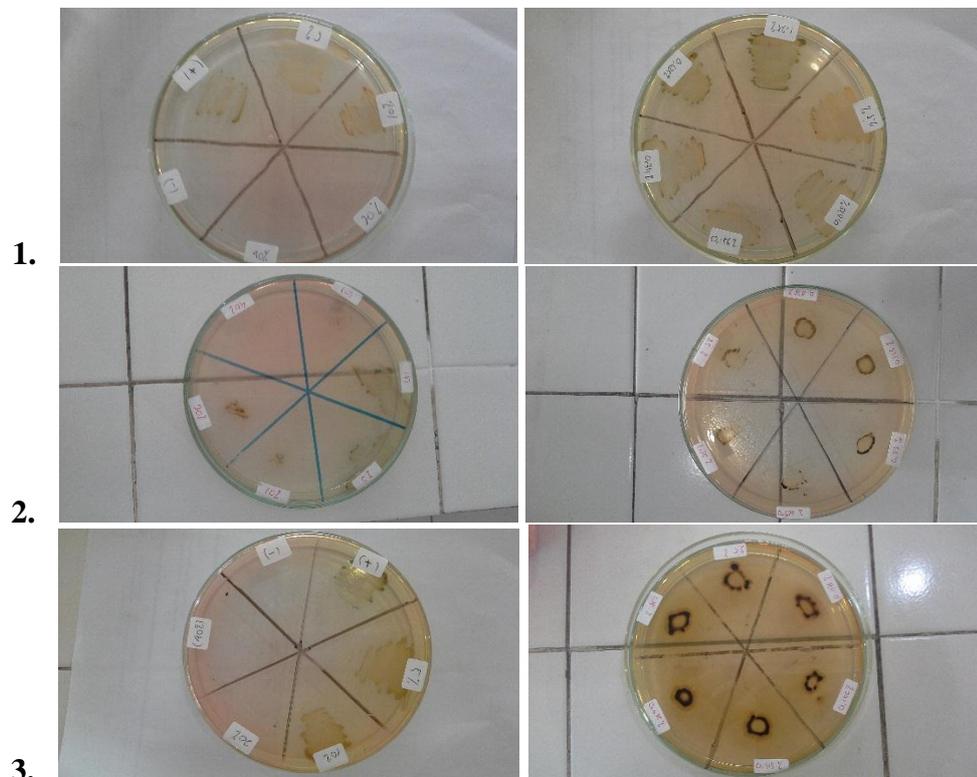
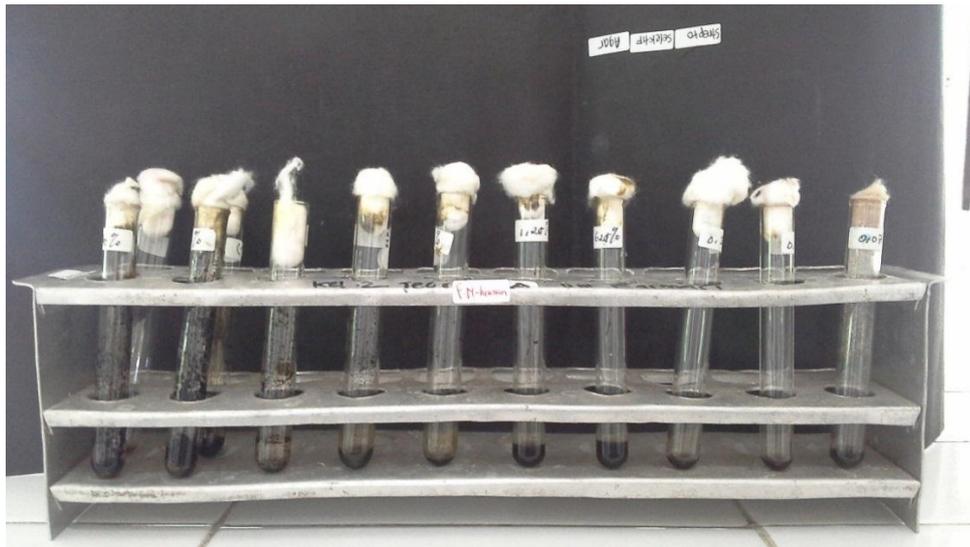


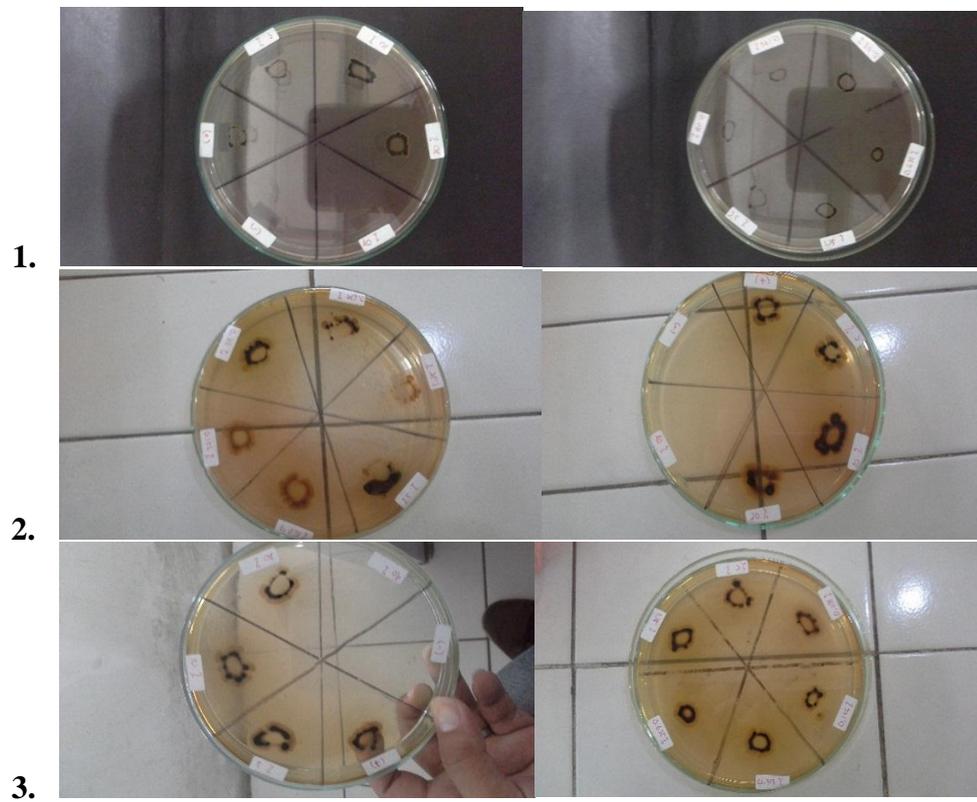
Foto hasil uji dilusi ekstrak etanol daun ashitaba



Hasil inokulasi ekstrak etanol daun ashitaba



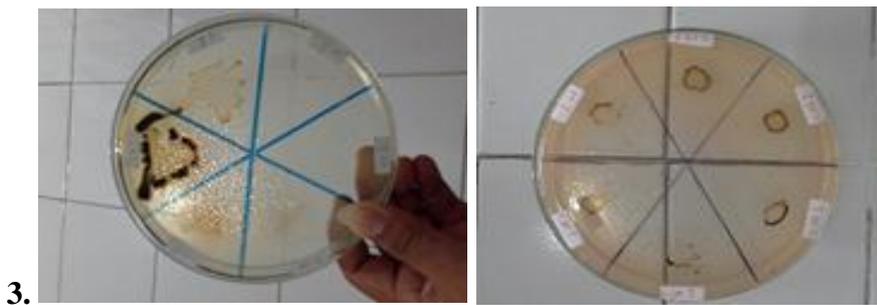
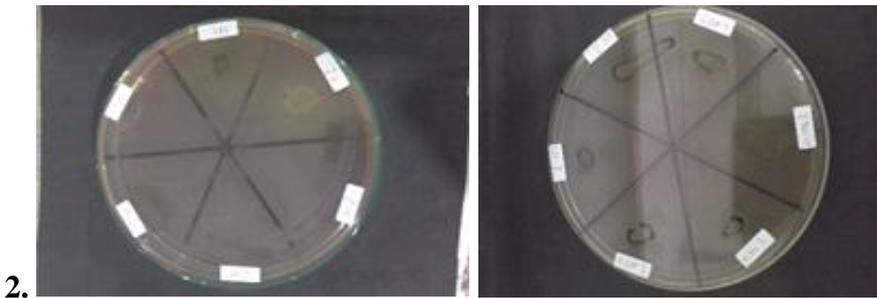
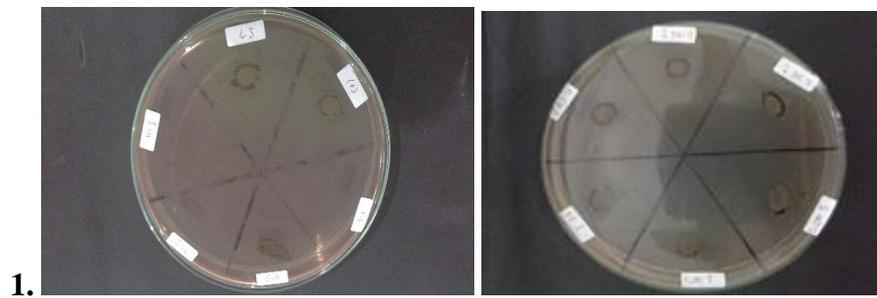
Hasil uji dilusi fraksi *n*-heksana



Hasil inokulasi fraksi *n*-heksana



Hasil uji dilusi fraksi etil asetat

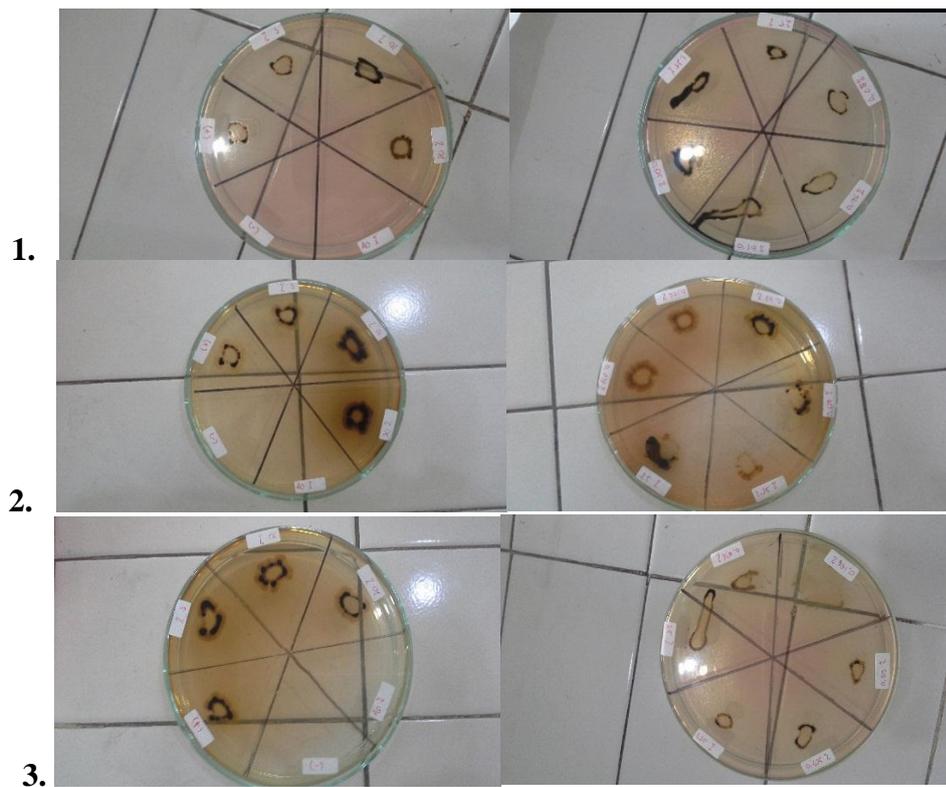


Hasil inokulasi



fraksi etil asetat

Hasil uji dilusi fraksi air

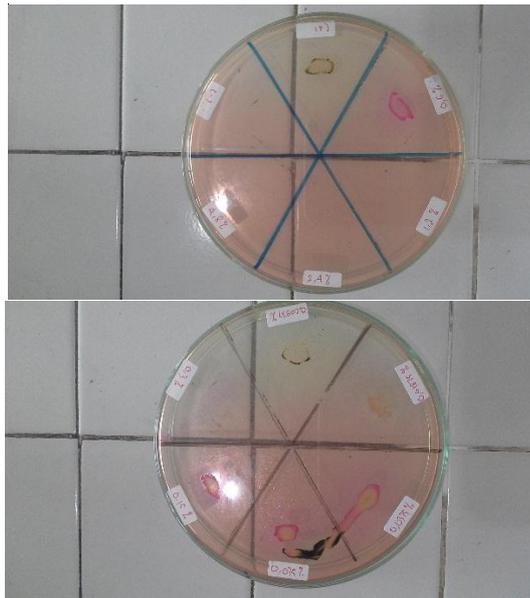


Hasil inokulasi fraksi air

**Lampiran 11. Hasil uji dilusi dan inokulasi amoksisilin terhadap bakteri
Salmonella typhi ATCC 19430**



Hasil uji dilusi antibiotik kotrimoksazol



Hasil uji dilusi antibiotik kotrimoksazol

Lampiran 12. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun ashitaba

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Persentase (%)
7.000	2.000	28,57

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen serbuk} &= \frac{\text{bobot kering (g)}}{\text{bobot basah (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{2.000 \text{ (g)}}{7.000 \text{ (g)}} \times 100 \% \\
 &= 28,57 \%
 \end{aligned}$$

Lampiran 13. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun ashitaba

Persentase bobot ekstrak maserasi daun ashitaba

Serbuk daun ashitaba (g)	Hasil ekstrak kental (g)	Rendemen ekstrak (%)
500	42,49	8,49

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen ekstrak etanol} &= \frac{\text{bobot ekstrak kental (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{42,49 \text{ (g)}}{500 \text{ (g)}} \times 100 \% \\
 &= 8,49 \%
 \end{aligned}$$

Rendemen fraksi *n*-heksana daun ashitaba

Bobot ekstrak etanol (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
20	4,21	21,05

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen fraksi } n\text{-heksana} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{4,21}{20} \times 100 \% \\
 &= 21,05 \%
 \end{aligned}$$

Rendemen fraksi etil asetat daun ashitaba

Bobot ekstrak etanol (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
20	2,25	11,25

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen fraksi etil asetat} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{2,25}{20} \times 100 \% \\
 &= 11,25 \%
 \end{aligned}$$

Rendemen fraksi air daun ashitaba

Bobot ekstrak etanol (g)	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
20	6,22	31,10

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen fraksi air} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak etanol (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{6,22}{20} \times 100 \% \\
 &= 31,10 \%
 \end{aligned}$$

Lampiran 14. Pembuatan larutan stok konsentrasi 40%

Larutan stok 40% = % $\frac{b}{v}$ = 40 gram/100 ml

Konsentrasi 40% = 0,4 gram/ ml

Konsentrasi 20% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

$$0,5 \cdot 40\% = 1 \cdot C2$$

$$C2 = 25\%$$

Konsentrasi 10% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

$$0,5 \cdot 20\% = 1 \cdot C2$$

$$C2 = 10\%$$

Konsentrasi 5% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

$$0,5 \cdot 10\% = 1 \cdot C2$$

$$C2 = 5\%$$

Konsentrasi 2,5% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

$$0,5 \cdot 5\% = 1 \cdot C2$$

$$C2 = 2,5\%$$

Konsentrasi 1,25% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

$$0,5 \cdot 2,5\% = 1 \cdot C2$$

$$C2 = 1,25\%$$

Konsentrasi 0,625% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

$$0,5 \cdot 0,625\% = 1 \cdot C2$$

$$C2 = 0,313\%$$

Konsentrasi 0,313% = $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

$$0,5 \cdot 0,625\% = 1 \cdot C2$$

$$C2 = 0,313\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,156\% = V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

$$0,5 \cdot 0,313\% = 1 \cdot C2$$

$$C2 = 0,156\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,078\% = V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

$$0,5 \cdot 0,156\% = 1 \cdot C2$$

$$C2 = 0,078\%$$

Kontrol negatif (-) berisi 1 ml ekstrak/ fraksi

Kontrol positif (+) berisi 0,5 ml suspensi bakteri + 0,5 ml BHI

Lampiran 15. Perhitungan pengujian dosis antibiotik kotrimoksazol

Kotrimoksazol 240 mg/5 ml = 4800 mg/100 ml

= 4,8 gram/100 ml

= 4,8 %

Konsentrasi 1 = 4,8 %

Konsentrasi 2 = 2,4 %

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

$$0,5 \cdot 4,8\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 2,4 \%$$

Konsentrasi 3 = 1,2%

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

$$0,5 \cdot 2,4 \% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 1,2 \%$$

Konsentrasi 4 = 0,6 %

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

$$0,5 \cdot 1,2 \% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,6 \%$$

Konsentrasi 5 = 0,3%

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

$$0,5 \cdot 0,6 \% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,3 \%$$

Konsentrasi 6 = 0,15%

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

$$0,5 \cdot 0,3 \% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,15 \%$$

Konsentrasi 7 = 0,075%

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

$$0,5 \cdot 0,15 \% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,075 \%$$

Konsentrasi 8 = 0,0375%

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

$$0,5 \cdot 0,075 \% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,0375 \%$$

Konsentrasi 9 = 0,01875%

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

$$0,5 \cdot 0,0375 \% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,01875 \%$$

Konsentrasi 10 = 0,00937%

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

$$0,5 \cdot 0,01875 \% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,00937 \%$$

Kontrol negatif (-) berisi 1 mL antibiotik kotrimoksazol

Kontrol positif (+) berisi 0,5 mL suspensi bakteri + 0,5 ml BHI

Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media

1. Formulasi dan pembuatan *salmonella, shigella agar* (SSA)

'lab-lemco' powder	5,0 gram
peptone	5,0 gram
Lactose	10,0 gram
Bile salts	8.5 gram
Sodium thiosulphate	8.5 gram
Ferric citrate	1,0 gram
Brilliant green	0,00033 gram
Neutral red.....	0.025 gram
Agar	15,0 gram

Reagen-reagen di atas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam plat(petri pH 7,4), media SSA tidak di autoclave karena ada zat yang akan rusak yakni sodium sitrate dan sodium thiosulphate

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

Brain infusion	12,5 gram
Heart infusion	5,0 gram
Proteose peptone	10,0 gram
Glucose	2,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
di-sodium hydrogen phosphate	2,5 gram

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