

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR
EKSTRAK ETANOL 70% DAUN BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor* L.)
TERHADAP *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 DENGAN
METODE DIFUSI**



oleh :

**Dellany Sarianggari
19133814 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR
EKSTRAK ETANOL 70% DAUN BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor* L.)
TERHADAP *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 DENGAN
METODE DIFUSI**

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Farmasi (S.F)*

*Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh:

**Dellany Sarianggari
19133814 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR EKSTRAK ETANOL 70% DAUN BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor* L.) TERHADAP *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 DENGAN METODE DIFUSI

Oleh

**Dellany Sarianggari
19133814 A**

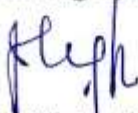
Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada Tanggal : 12 Juni 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi

 
Dekan

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

Pembimbing Utama,



Reslely Harjanti, M.Sc., Apt
Pembimbing Pendamping,



Opstaria Saptarini, M.Si., Apt

Penguji :

1. Dr. Supriyadi, M.Si.

1. 

2. Dr. Ana Indrayati, M.Si.

2. 

3. Sri Rejeki Handayani, M.Farm., Apt

3. 

4. Reslely Harjanti, M.Sc., Apt

4. 

PERSEMBAHAN

Tetapi boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu. Allah Mengetahui sedang kamu tidak mengetahui. (Q. S. Al-Baqaeah : 216)

Dan bahwa manusia hanya memperoleh apa yang telah diusahakannya, dan sesungguhnya usahanya itu kelak akan diperlihatkan (kepadanya), kemudian akan diberi balasan kepadanya dengan balasan yang paling sempurna

Skripsi ini kupersembahkan kepada :

Mama, Papa dan adikku tersayang yang selalu tak henti memberiku semangat dan doa disetiap langkahku

Keluargaku, Sahabatku yang selalu menemani selama ini dan selalu memberi dukungan

Teman seperjuanganku 2013 dan almamaterku

PERNYATAAN

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

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

Surakarta, 12 Juni 2017

Tanda tangan

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dellany Sarianggari'. The signature is stylized with a large, rounded initial 'D' and a long, sweeping horizontal stroke.

Dellany Sarianggari

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Skripsi yang berjudul **“AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI n-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR EKSTRAK ETANOL 70% DAUN BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor L.*) Terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 METODE DIFUSI ”**.

Penyusunan Skripsi ini untuk memenuhi persyaratan guna mencapai derajat S-1 dalam Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Dalam penyusunan Skripsi tidak lepas berkat bantuan, bimbingan serta dukungan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada yang terhormat :

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta
2. Prof. Dr. R. A Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Reslely Harjanti, M.Sc., Apt., selaku Pembimbing Utama yang telah banyak memberikan bimbingan serta arahan dalam pembuatan Skripsi ini.
4. Opstaria Saptarini, M.Si., Apt., selaku Pembimbing Pendamping yang telah banyak memberikan bimbingan serta arahan dalam pembuatan Skripsi ini.
5. Tim penguji skripsi yang telah menyediakan waktu untuk menguji dan memberikan masukan kepada peneliti untuk penyempurnaan Skripsi ini.
6. Staff laboratorium dan Staff perpustakaan Universitas Setia Budi yang banyak membantu dalam pelaksanaan praktek Skripsi ini.
7. Mama, Papa dan adikku tersayang Moch. Dava Erwinsyah yang selalu memberikan semangat, motivasi, dan doa yang tiada hentinya untuk masa depan dan kesuksesanku..
8. Sahabat dan juga pembimbing Riska Yulita yang telah memberikan banyak arahan dan membantu dalam penyusunan Skripsi ini. .

9. Semua sahabat dan teman yang tidak dapat saya sebutkan semua yang selalu memberikan semangat dan membuat tawa dan canda untuk jangan menyerah.
10. Keluarga Kos Kharisma, Aprillia Saputri, Maulita Saraswati, Enna Narulita, Disa Lintang Sari, Aisyah Romadhon, Nuzul Rizky Maslina, Nunung Mutoharoh yang telah menjadi keluarga kedua di perantauan.
11. Semua teman angkatan 2013 S-1 Farmasi Universitas Setia Budi.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan Skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan Skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan, untuk itu maka penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi kelengkapan Skripsi ini. Penulis berharap Skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis, pembaca serta untuk perkembangan ilmu kesehatan.

Surakarta, 12 Juni 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI.....	ii
PERSEMBAHAN.....	iv
PERNYATAAN.....	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Kegunaan Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Tanaman Bayam Merah	5
1. Sistematika tanaman.....	5
2. Nama lain	5
3. Etiologi dan penyebarannya	5
4. Morfologi tanaman	6
5. Khasiat dan sifat	6
6. Kandungan kimia	6
6.1. Flavonoid.....	7
6.2. Saponin.....	7
6.3. Alkaloid.....	7
6.4. Polifenol.....	8
B. Simplisia.....	8
1. Pengertian simplisia	8
2. Pengeringan dan pencucian simplisia.....	8
C. Metode Penyarian.....	9

1.	Ekstraksi	9
2.	Maserasi.....	10
3.	Fraksinasi.....	10
4.	Cairan penyari untuk ekstraksi	10
4.1.	Etanol.....	10
4.2.	<i>n</i> -heksana.	10
4.3.	Etil asetat.....	11
4.4.	Air.	11
D.	<i>Shigella dysenteriae</i>	11
1.	Sistematika bakteri.	11
2.	Morfologi dan sifat.....	11
3.	Toksin.....	12
4.	Patogenesis	12
5.	Pengobatan	13
E.	Antibakteri.....	13
1.	Definisi	13
2.	Mekanisme kerja antibakteri	14
2.1.	Penghambatan metabolisme sel.	14
2.2.	Penghambatan sintesis dinding sel.	14
2.3.	Penghambatan keutuhan membran sel.	14
2.4.	Penghambatan sintesis protein.	15
2.5.	Penghambatan sintesis asam nukleat.	15
3.	Uji aktivitas antibakteri	15
3.1.	Metode difusi.	15
3.2.	Metode dilusi.....	16
F.	Mc Farland 0,5.....	17
G.	Kromatografi Lapis Tipis	17
H.	Media.....	18
1.	Pengertian media	18
2.	Jenis-jenis media pertumbuhan bakteri	18
2.1.	Media sintetik.....	18
2.2.	Media Kompleks.....	18
2.3.	Media biakan khusus.	18
2.4.	Media selektif dan diferensial.	18
2.5.	Media anaerob.	19
2.6.	Media pengayaan.	19
I.	Kotrimoksazol	19
J.	Sterilisasi	20
K.	Landasan Teori	20
L.	Hipotesis	22
BAB III METODE PENELITIAN		23
A.	Populasi dan Sampel.....	23
B.	Variabel Penelitian	23
1.	Identifikasi variabel utama	23
2.	Klasifikasi variabel utama	23

3.	Definisi operasional variabel utama	24
C.	Alat dan Bahan	24
1.	Alat	24
2.	Bahan	25
D.	Jalannya Penelitian	25
1.	Determinasi daun bayam merah	25
2.	Pengambilan bahan	25
3.	Pengeringan dan pembuatan serbuk daun bayam merah	25
4.	Penetapan kadar lembab dalam serbuk daun bayam merah	26
5.	Pembuatan ekstrak etanol 70% daun bayam merah	26
6.	Uji bebas etanol ekstrak daun bayam merah	26
7.	Identifikasi kandungan kimia serbuk daun bayam merah	26
7.1.	Flavonoid	26
7.2.	Alkaloid	27
7.3.	Saponin	27
7.4.	Polifenol	27
8.	Pembuatan fraksi n-heksana daun bayam merah secara fraksinasi	27
9.	Pembuatan fraksi etil asetat daun bayam merah secara fraksinasi	27
10.	Pembuatan fraksi air secara fraksinasi	28
11.	Sterilisasi alat dan bahan	28
12.	Pembuatan suspensi bakteri uji	28
13.	Identifikasi bakteri uji	28
13.1.	Identifikasi bakteri secara goresan	28
13.2.	Identifikasi bakteri uji secara biokimia	28
14.	Pengujian antibakteri secara difusi	29
15.	Kromatografi lapis tipis	30
15.1.	Identifikasi flavonoid	30
15.2.	Identifikasi alkaloid	30
15.3.	Identifikasi saponin	31
15.4.	Identifikasi polifenol	31
E.	Pengamatan Hasil	31
F.	Skema Jalannya Penelitian	32
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		34
A.	Hasil Penelitian Daun Bayam Merah	34
1.	Determinasi tanaman bayam merah	34
2.	Pengambilan sampel	34
3.	Pembuatan serbuk daun bayam merah	34
4.	Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun bayam merah	35
5.	Identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun bayam merah	35
6.	Pembuatan ekstrak etanol daun bayam merah	36

7. Uji bebas etanol ekstrak daun bayam merah	37
8. Fraksinasi ekstrak daun bayam merah.....	37
9. Hasil identifikasi fraksi aktif secara Kromatografi Lapis Tapis (KLT)	38
B. Hasil Identifikasi Antibakteri	39
1. Pembuatan suspensi bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 9361	39
2. Identifikasi bakteri uji <i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 9361	39
2.1. Inokulasi <i>Shigella dysenteriae</i>	39
2.2. Identifikasi <i>Shigella dysenteriae</i> secara pengecatam Gram.....	39
3. Hasil pengujian efek antibakteri ekstrak etanol fraksi n- heksana, eter dan air daun bayam merah secara difusi.....	41
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	45
A. Kesimpulan.....	45
B. Saran	45
 DAFTAR PUSTAKA	46
 LAMPIRAN.....	52

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1.	Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun bayam merah.	32
Gambar 2.	Skema pengujian aktivitas antibakteri secara difu.....	33
Gambar 3.	Grafik diameter hambat	42

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil rendemen daun kering terhadap daun basah	35
Tabel 2. Hasil penetapan kadar air serbuk daun bayam merah	35
Tabel 3. Hasil identifikasi kandungan kimia daun bayam merah.....	36
Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak etanol daun bayam merah	37
Tabel 5. Rendemen hasil fraksi n-heksana, etil asetat, dan air.....	38
Tabel 6. Identifikasi uji biokimia <i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 9361.....	40
Tabel 7. Hasil uji difusi dari ekstrak etanol fraksi n-heksana, etil asetat dan air daun bayam merah terhadap <i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 9361 pada media MHA (<i>Media Hinton Agar</i>)	41

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Surat keterangan melakukan Identifikasi/determinasi tanaman.....	53
Lampiran 2. Foto tanaman dan serbuk daun bayam merah (<i>Amaranthus tricolor</i> L)	54
Lampiran 3. Foto alat Moisture Balance	54
Lampiran 4. Foto alat evaporator.....	55
Lampiran 5. Foto Fraksinasi	55
Lampiran 6. Foto identifikasi senyawa serbuk dan ekstrak daun bayam merah (<i>Amaranthus tricolor</i> L)	56
Lampiran 7. Identifikasi senyawa fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun bayam merah (<i>Amaranthus tricolor</i> L)	58
Lampiran 8. Foto hasil identifikasi bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 9361	59
Lampiran 9. Foto hasil pengujian Antibakteri Metode Difusi.....	60
Lampiran 10. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah.....	63
Lampiran 11. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan daun bayam merah.....	63
Lampiran 12. Pembuatan larutan uji pada metode difusi.....	64
Lampiran 13. Perhitungan Rf.....	65
Lampiran 14. Formulasi dan pembuatan media.....	66
Lampiran 15. Uji statistika.....	71

INTISARI

SARIANGGARI, D., 2017, AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR EKSTRAK ETANOL 70% DAUN BAYAM MERAH (*Amaranthus tricolor* L.) TERHADAP *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 DENGAN METODE DIFUSI, SKIRPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) adalah tanaman yang secara empiris berkhasiat sebagai obat nyeri perut atau diare. Kandungan kimia daun bayam merah adalah flavonoid, alkaloid saponin dan polifenol. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan ekstrak etanolik daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) sebagai antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi dengan pelarut ekstraksi etanol 70% dilanjutkan dengan fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi. Konsentrasi yang digunakan adalah 25%, 50%, dan 75%. Data yang diperoleh diolah dengan analisis statistik *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan metode satu jalur, sehingga didapat hasil signifikansi dari data tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi 25%, 50%, dan 75% fraksi etil asetat memiliki daya hambat yang paling aktif dibandingkan fraksi *n*-heksana dan air yaitu pada konsentrasi 50% terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 dengan diameter hambat sebesar 17,67 mm \pm SD 0,57.

Kata kunci: antibakteri, *Shigella dysenteriae*, daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.)

ABSTRACT

SARIANGGARI, D., 2017, ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF RED SPINACH LEAF (*Amaranthus tricolor* L.) N-HEXANE, ETHYL ACETAT AND WATER FRACTION AGAINST *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 METHOD OF DIFFUSION, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Red spinach leaf (*Amaranthus tricolor* L.) is a plant which empirically efficacious as drug abdominal pain or diarrhea. Red spinach leaf chemical constituents are flavonoids, alkaloids, saponins and polyphenols. The research was conducted to determine the fraction activity n-hexane, ethyl acetate, water and ethanolic extract of red spinach leaf (*Amaranthus tricolor* L.) as antibacterial against *Shigella dysenteriae* ATCC 9361

The method was used in this research is the method maceration with 70% ethanol extraction solvent followed by solvent fracination n-hexane, ethyl acetate and water. Antibacterial activity test performed by the diffusion method. The concentration was used is 25%, 50% and 75%. The data obtained were processed with statistical analysis Analysis of Variance (ANOVA) with a one-track method, so the significance of the results obtained from these data.

The results showed that at concentration 25%, 50%, dan 75% ethyl acetate fraction had the most active inhibition power compared to n-hexane dan water fractions that is at 50% concentratiton against *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 bacteria with inhibitory diameter Of 17,67 mm \pm SD 0,57.

Keywords: antibacterial, *Shigella dysenteriae*, red spinach leaf (*Amaranthus tricolor* L.)

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan ancaman yang sangat besar untuk umat manusia. Infeksi ditimbulkan karena adanya agen infeksius yang menyerang tubuh manusia, baik secara langsung maupun melalui perantara. Agen infeksius dapat berupa bakteri, virus, jamur, dan parasit (Arias 2003). Perbedaan dari masing-masing agen infeksius bakteri, virus, jamur, dan parasite dapat dilihat dari morfologi dan struktur anatominya.

Disentri merupakan suatu infeksi akut radang colon yang disebabkan kuman genus *Shigella*. Disentri ditularkan secara oral melalui air, makanan, lalat yang tercemar oleh pasien. Penyakit ini berlangsung dari beberapa jam sampai tiga hari. Adapun gejala yang timbul yaitu defekasi sedikit-sedikit, sakit perut dengan rasa kolik, mejan, muntah-muntah dan sakit kepala (Noer *et al.* 1996).

Masalah diare di Indonesia sering terjadi dalam bentuk Kejadian Luar Biasa (KLB). KLB diare sering terjadi terutama di daerah yang pengendalian faktor risikonya masih rendah. Cakupan perilaku higienis dan sanitasi yang rendah sering menjadi faktor risiko terjadinya KLB diare (Depkes 2011). KLB diare pada tahun 2013 terjadi di 6 provinsi dengan penderita terbanyak terjadi di Jawa Tengah yang mencapai 294 kasus. Sedangkan angka kematian akibat KLB diare tertinggi terjadi di Sumatera Utara yaitu sebesar 11,76%. CFR diare yang terjadi di Sumatera Utara Tahun 2013 mengalami kenaikan dibandingkan Tahun 2012, yaitu dari 1,22% menjadi 11,76% (Depkes 2013). Dinas Kesehatan Kota Sibolga mencatat sebanyak 2150 masyarakat yang mengalami diare selama tahun 2010. Pada tahun 2011-2013 penderita diare di sibolga mengalami penurunan masing-masing tiap tahun menjadi 1737, 1712, dan 1307 orang. Akan tetapi pada tahun 2014, jumlah penderita diare kembali meningkat menjadi 1572 orang. (Dinkes Sibolga 2014).

Di Indonesia dari 2.812 pasien diare yang disebabkan bakteri yang datang kerumah sakit dari beberapa provinsi penyebab terbanyak adalah *Vibrio cholerae*,

diikuti dengan *Shigella spp*, *Salmonella spp*, *Vibrio Parahaemoliticus*, *Salmonella typhi*, *Campylobacter Jejuni*, *Vibrio Cholera non-01*, dan *Salmonella paratyphi A*. Diare yang muncul sering bercampur darah. Banyak *Shigella dysenteriae* mengalami resisten terhadap antibiotik antara lain disebabkan oleh penggunaan antibiotik yang tidak tepat (Todarr 2009).

Shigella dapat menular melalui makanan, jari-jari tangan, feses, dan alat dari orang yang terinfeksi ke orang normal. Kebanyakan penyakit ini terjadi pada umur 1-10 tahun dan menjadi suatu masalah kesehatan yang sangat penting untuk diperhatikan, karena pada penyakit ini penderita dapat mengalami diare yang hebat hingga 20-30 kali sehari yang dapat mengakibatkan penderita kehilangan cairan tubuh dan bila tidak segera diatasi dehidrasi tersebut akan dapat mengakibatkan terjadinya kematian (Jawetz *et al.* 2005).

Shigella dysenteriae merupakan salah satu bakteri penyebab disentri. *Shigella dysenteriae* menghasilkan endotoxin sebagai penyebab iritasi dinding usus. Penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri ini adalah disentri basilar dengan gejala sakit perut, nyeri, diare dan demam, tinja encer mengandung lendir dan darah (Suryono 1995).

Salah satu pengobatan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri yaitu dengan pemberian antibiotik. Perkembangan resistensi *Shigella dysenteriae* terhadap antibiotik semakin meluas sehingga untuk pengobatannya diperlukan alternatif lain (Harun 2009). Menurut Laporan *World Health Organization* (2005), bakteri genus *Shigella* resisten terhadap multi antibiotik sebagai akibat pemakaian antibiotik yang tidak tepat. Oleh karena itu sudah banyak ditemukan bakteri *Shigella dysenteriae* yang resisten terhadap banyak antibiotik, maka dalam penelitian ini digunakan obat dari tanaman tradisional untuk diuji aktivitas antibakterinya. Tanaman obat sering dipilih sebagai alternatif dalam pengobatan karena lebih mudah ditemukan dan digunakan oleh masyarakat.

Secara tradisional, bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) dapat meningkatkan kerja ginjal dan melancarkan pencernaan, selain itu akar dari bayam merah berkhasiat sebagai obat disentri. Bayam termasuk sayuran berserat yang dapat digunakan untuk memperlancar proses buang air besar. Makanan

berserat sangat dianjurkan untuk dikonsumsi oleh penderita kanker usus besar, penderita kencing manis (diabetes mellitus), kolesterol atau darah tinggi, dan menurunkan berat badan (Dalimartha 2000).

Di masyarakat daun bayam merah biasanya digunakan secara turun-temurun untuk melancarkan ASI, penurun tekanan darah, penambah darah (Trihardjana 2007) serta dapat digunakan sebagai antibakteri (Kusmiati 2014).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan *Amaranthus tricolor L.* memiliki penghambatan spesifik salah satu bakteri yang diuji yaitu *Bacillus cereus* dengan menggunakan metode mikrodilusi, konsentrasi hambat minimum (MIC) pada konsentrasi 20 mg / mL (Aziz *et al* 2011).

Berdasarkan permasalahan tersebut, penulis terpacu untuk melakukan penelitian tentang daun bayam merah sebagai antibakteri. Uji aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* ini dilakukan dengan metode difusi dan menggunakan metode maserasi. Fraksinasi ekstrak etanol daun bayam merah bertujuan untuk menarik senyawa kimia yang diinginkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Berbagai pelarut yang digunakan yaitu etanol 70 %, *n*-heksana, etil asetat, dan air.

B. Perumusan Masalah

Perumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

Pertama, apakah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361?

Kedua, dari ketiga fraksi dan ekstrak daun bayam merah (*Amaranthus tricolor L.*) tersebut manakah yang memiliki aktivitas antibakteri paling aktif dalam menghambat *Shigella dysenteriae* ATCC 9361?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan pertama, untuk mengetahui dan membuktikan aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361.

Kedua, untuk mengetahui aktivitas antibakteri yang paling aktif di antara fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) dalam menghambat *Shigella dysenteriae* ATCC 9361.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi, wawasan dan ilmu pengetahuan serta berguna bagi seluruh masyarakat tentang aktivitas daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) sebagai antibakteri khususnya terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361, sehingga dapat digunakan sebagai obat tradisional yang mudah penggunaannya, efektif, murah serta mudah dicari dan dapat dikembangkan sebagai fitofarmaka. Bagi peneliti diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah tentang manfaat fraksi dari ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) sebagai antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Bayam Merah

1. Sistematika tanaman

Menurut klasifikasi dalam tata nama (sistematika) tumbuhan, tanaman bayam merah termasuk ke dalam :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Sub Class	: Hamamelidae
Ordo	: Caryophyllales
Familia	: Amaranthaceae
Genus	: <i>Amaranthus</i>
Species	: <i>Amaranthus tricolor</i> L. (Saparinto 2013).

2. Nama lain

Nama daerah

Jakarta : bayam glatik, bayam putih, bayam merah. Jawa : bayem abrit, bayam lemah, bayam ringgit, bayam sekul, bayam siti. Maluku: jawa lufife, tona magaahu, hohoruitoka tokara, bayam roriha, loda kohori.

Nama asing

Chinese spinach (I)

Nama simplisia

Amaranthi tricoloris Folium (daun bayam), *Amaranthi tricoloris Radix* (akar bayam).

3. Etiologi dan penyebarannya

Di Asia Timur dan Asia Tenggara, bayam sayur biasa disebut Chinese amaranth. Tanaman bayam berasal dari Amerika, mudah tumbuh dan tersebar di daerah tropis dan sub tropis di seluruh dunia. Di Indonesia sendiri bayam dapat

tumbuh sepanjang tahun dan ditemukan pada ketinggian 5 – 2.000 m dpl, tumbuh di daerah panas dan dingin, tetapi tumbuh lebih subur di dataran rendah pada lahan terbuka yang udaranya agak panas. Ditingkat konsumen, dikenal dua macam bayam sayur, yaitu bayam petik dan bayam cabut. Bayam petik berdaun lebar dan tumbuh tegak dengan batang yang besar hingga dua meter (Saparinto 2013).

4. Morfologi tanaman

Tanaman bayam merah memiliki ciri berdaun tunggal, ujungnya meruncing, lunak, dan lebar. Batangnya lunak dan berwarna putih kemerah-merahan. Bunga bayam merah ukurannya kecil muncul dari ketiak daun dan ujung batang pada rangkaian tandan. Buahnya tidak berdaging, tetapi bijinya banyak, sangat kecil, bulat, dan mudah pecah. Tanaman ini memiliki akar tunggang dan berakar samping. Akar sampingnya kuat dan agak dalam. Tanaman ini berbentuk perdu atau semak. Bayam merah memiliki banyak manfaat karena mengandung vitamin A dan C, sedikit vitamin B, kalsium, fosfor, dan besi (Sunarjono 2014).

5. Khasiat dan sifat

Tanaman bayam secara umum dapat meningkatkan kerja ginjal dan memperlancar pencernaan. Akar bayam merah berkhasiat sebagai disentri. Bayam termasuk sayuran berserat yang dapat digunakan untuk memperlancar proses buang air besar. Makanan berserat sangat dianjurkan untuk dikonsumsi oleh penderita kanker usus besar, kencing manis (*diabetes melitus*), kolesterol, darah tinggi, dan kegemukan (Dalimarta 2000). Hasil penelitian menegaskan potensi terapi daun *Amaranthus tricolor* untuk penemuan senyawa antibakteri mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* (Sowjanya Pulipati *et al.* 2014)

6. Kandungan kimia

Menurut Latief (2012), daun bayam terkenal sebagai sayuran dengan sumber zat besi (Fe). Selain itu, bayam mengandung antioksidan, seperti karotenoid, polifenol, dan flavonoid (kuersetin). Menurut Dalimartha (2004),

selain mengandung zat besi yang berguna bagi penderita anemia, bayam juga mengandung vitamin (A, B, dan C), kalium, dan kalsium.

Flavonoid dan polifenol pada penelitian sebelumnya diduga bisa memberikan efek laksatif. Komponen tersebut secara signifikan dapat menambah pengeluaran feses dan menstimulasi motilitas saluran cerna (Jeevanandhan 2013).

6.1. Flavonoid. Flavonoid adalah senyawa yang terdapat dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin saja terdapat dalam satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida, larut dalam air. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran, jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal dalam jaringan tumbuhan (Harbone 2006). Senyawa flavonoid merupakan golongan senyawa fenol, mekanisme kerjanya dengan mendenaturasikan protein sel dan merusak membran sel mikroorganisme. Substansi yang dapat mendenaturasikan protein dan merusak sel tanpa dapat diperbaiki lagi sehingga pertumbuhan mikroba terhambat (Gunawan & Mulyani 2004).

6.2. Saponin. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Terdapat dua jenis saponin yaitu triterpenoid alkohol, dan glikosida struktur steroid tertentu yang mempunyai rantai samping spiroketal. Saponin bersifat spermisida, antimikroba, antiperadangan, dan memiliki aktivitas sitotoksik (Tjay & Rahardja 2002).

6.3. Alkaloid. Alkaloid merupakan senyawa zat tumbuhan sekunder yang terbesar. Pada umumnya alkaloid mencakup senyawa yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih senyawa nitrogen, biasanya dalam gabungan sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid tidak memiliki warna, bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan pada suhu kamar (Harbone 1987). Kemampuan senyawa alkaloid sebagai antibakteri dilakukan dengan menggunakan komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel pada bakteri tersebut (Alamsyah & Kurniawan 2014).

6.4. Polifenol. Polifenol merupakan kelompok zat kimia yang aktif sebagai antiseptic yang bekerja menghambat pertumbuhan mikroorganisme dengan mendenaturasi protein sel dan membrane sel (Robinson 1995). Polifenol memiliki spektrum luas dengan sifat kelarutan pada pelarut yang berbebeda-beda. Hal ini disebabkan oleh gugus hidroksil pada senyawa tersebut berbeda jumlah dan posisinya. Fitokimia plifenol banyak terdapat pada buah-buahan dan sayur-sayuran hijau. Penelitian pada hewan dan manusia menunjukkan bahwa polifenol dapat mengatur kadar gula darah seperti antikanker, antioksidan, dan antimikroba (Lenny 2006).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia merupakan hasil proses sederhana dari herba tanaman obat yang banyak digunakan sebagai bahan baku industri obat, sementara ekstrak merupakan hasil proses semi modern dengan kandungan bahan aktif lebih tinggi dari bahan mentah asalnya. Pembuatan simplisia dengan cara pengeringan dimaksudkan untuk menurunkan kandungan air dalam bahan (Ma'mun *et al.* 2006). Jika kadar air dalam bahan masih tinggi dapat mendorong enzim mendorong enzim melakukan aktifitasnya mengubah kandungan kimia yang ada dalam bahan menjadi produk lain yang mungkin tidak lagi memiliki efek farmakologi seperti senyawa aslinya. Hal ini tidak akan terjadi jika bahan yang telah dipanen segera dikeringkan sehingga kadar airnya rendah. Beberapa enzim perusak kandungan kimia yang telah lama dikenal antara lain hidrolase, oksidase, polymerase (Prasetyo & Inorih 2013)

2. Pengeringan dan pencucian simplisia

Pencucian dilakukan untuk memisahkan kotoran atau bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih. Bahan simplisia yang mengandung zat yang mudah larut dalam air, pencucian agar dilakukan dalam waktu yang sesingkat mungkin (Prastowo 2013).

Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Penurunan

mutu atau merusakkan simplisia dapat dicegah dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik. Reaksi enzimatik tidak akan berlangsung bila kadar air dalam simplisia kurang dari 10%. Proses pengeringan sudah dapat menghentikan proses enzimatik dalam sel bila kadar airnya dapat mencapai kurang dari 10% (Prastowo 2013).

Menurut Pramono (2005) jika kadar air dalam bahan masih tinggi dapat memicu enzim melakukan aktivitasnya mengubah kandungan kimia yang ada dalam bahan menjadi produk lain yang mungkin tidak lagi memiliki efek farmakologi seperti senyawa aslinya. Hal ini tidak akan terjadi jika bahan yang telah dipanen segera dikeringkan sehingga kadar airnya rendah. Beberapa enzim merusak kandungan kimia yang telah lama dikenal antara lain hidrolase, oksidase, dan polimerase.

C. Metode Penyarian

1. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI 2000). Pemilihan pelarut sangat penting dalam proses ekstraksi sehingga bahan berkhasiat yang akan ditarik dapat tersari sempurna (Farouq 2003).

Ekstrak tumbuhan obat yang dibuat dari simplisia nabati dapat dipandang sebagai bahan awal, bahan antara atau bahan produk jadi. Ekstrak sebagai bahan awal dianalogkan dengan komoditi bahan baku obat yang dengan teknologi fitofarmasi diproses menjadi produk jadi. Ekstrak sebagai bahan antara berarti masih menjadi bahan yang dapat diproses lagi menjadi fraksi-fraksi, isolate senyawa tunggal atau sebagai campuran dengan ekstrak lain. Ekstrak sebagai produk jadi berarti ekstrak yang berada dalam sediaan obat jadi siap digunakan oleh penderita (Depkes 2000).

2. Maserasi

Metode ekstraksi maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu kamar (Indraswari 2008). Metode ekstraksi maserasi dipilih karena memiliki banyak keuntungan dibandingkan metode ekstraksi lainnya. Keuntungan utama metode ekstraksi maserasi yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, metode ekstraksi maserasi tidak memerlukan pemanasan sehingga bahan alam tidak terurai. Ekstraksi dingin memungkinkan banyak senyawa terekstraksi, meskipun beberapa senyawa memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut ekstraksi pada suhu kamar (Istiqomah 2013).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu cara untuk memisahkan golongan utama, kandungan satu dari golongan utama lainnya berdasarkan polaritas. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan terjadi fraksi yang berbeda. Senyawa yang bersifat nonpolar akan masuk ke pelarut nonpolar, senyawa semi polar akan masuk ke pelarut semi polar, sedangkan yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar. Keuntungan fraksinasi adalah diperolehnya isolate atau senyawa yang lebih spesifik terhadap polaritas pelarut yang digunakan (Harbone 2007).

4. Cairan penyari untuk ekstraksi

4.1. Etanol. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kumarin, flavonoid, antrakuinon, steroid, dan klorofil. Lemak, malam, tanin, dan saponin hanya sedikit larut. Etanol dipertimbangkan sebagai larutan penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman kulit tidak dapat tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air pada skala perbandingan, panas diperlukan lebih sedikit (Depkes 1986).

4.2. *n*-heksana. Pelarut *n*-heksana merupakan pelarut nonpolar berupa cairan jernih, tidak berwarna, dapat bercampur dengan etanol, mudah menguap, mudah terbakar, dan mempunyai bau seperti eter lemah atau bau seperti petroleum, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa nonpolar, misalnya golongan kandungan kimia

minyak atsiri, lemak, dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid, dan korotenoid (Tiwari *et al.*2011)

4.3. Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut yang mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas rendah (USP 2007; Rowe *et al.* 2009; Wardhani dan Sulistyani 2012). Etil asetat bersifat semi polar sehingga mampu menarik senyawa aglikon maupun glikon flavonoid. Etil asetat dapat digunakan sebagai pelarut karena dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, polifenol, dan triterpenoid (Putri *et al.* 2013).

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

D. *Shigella dysenteriae*

1. Sistematika bakteri.

Sistematika bakteri *Shigella dysenteriae* menurut Raharja (2006), adalah sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria
 Class : Gamma Proteobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Famili : Enterobacteriaceae
 Genus : Shigella
 Species : *Shigella dysenteriae*

2. Morfologi dan sifat.

Shigella dysenteriae merupakan bakteri gram negatif yang tipis atau ramping, tidak berkapsul, dan tidak membentuk spora, bentuk *Coccobacilli* terjadi

pada pembedihan muda. Bakteri ini merupakan salah satu bakteri fakultatif anaerob, tetapi dapat tumbuh dengan baik secara aerob. Koloni *Shigella* berbentuk cembung, bundar, transparan dengan diameter kira-kira 2 mm dalam 24 jam. Semua *Shigella* memfermentasikan glukosa. *Shigella* membentuk asam dari karbohidrat tetapi jarang memproduksi gas. *Shigella dysenteriae* ditemukan pada tahun 1896 oleh ahli mikrobiologi Jepang, Kiyoshi Shiga. Ini adalah pertama di spesies untuk ditemukan, sekarang ada tiga orang lain yang berbagi genus: *Sonnei boydii*, *flexneri*. *Shigella* adalah Gram-negatif, batang (*bacillus*) berbentuk, non-motil, tidak membentuk spora, bakteri anaerob fakultatif yang tidak *capsulated*. Bakteri ini mampu bertahan hidup lingkungan yang terkontaminasi serta keasaman saluran gastro-intestinal manusia.

3. Toksin

Shigella dysenteriae dapat menyebabkan penyakit disentri basilar. Disentri basilar adalah infeksi usus besar oleh bakteri pathogen genus *Shigella*. *Shigella dysenteriae* merupakan penyebab penyakit yang paling ganas dan menimbulkan epidemic hebat di daerah tropis dan subtropics (Soedarto, 1996). Pengobatan infeksi dapat digunakan dengan antibiotik yang telah diresepkan secara luas seperti pada saat sekarang ini (Gould & Brooker, 2003).

4. Patogenesis

Shigellosis disebut juga disentri basiler, disentri sendiri artinya salah satu dari berbagai gangguan yang ditandai dengan peradangan usus, terutama kolon dan disertai nyeri perut, tenesmus dan buang air besar yang sering mengandung darah dan mucus. Habitat alamiah bakteri disentri adalah usus besar manusia, tempat tersebut dapat menyebabkan disentri basiler. Infeksi *Shigella dysenteriae* praktis selalu terbatas pada saluran pencernaan, dan invasi bakteri ke dalam darah sangat jarang. *Shigella dysenteriae* menimbulkan penyakit yang sangat menular dengan dosis infeksi dari bakteri. *Shigella dysenteriae* adalah kurang dari 10^3 organisme dan merupakan golongan *Shigella sp* yang cenderung resisten terhadap antibiotik (Jewetz *et al* 2005).

5. Pengobatan

Shigella dysenteriae memproduksi eksotoksin tidak tahan panas dan mempengaruhi saluran pencernaan dan susunan syaraf pusat. Eksotoksin merupakan enterotoksin yang dapat menimbulkan diare. Infeksi *Shigella* sangat menular, untuk menimbulkan infeksi diperlukan dosis kurang dari 10^3 organisme (Jawetz *et al* 2005). Terapi dengan rehidrasi yang adekuat secara oral atau intravena, tergantung dari keparahan penyakit. Terapi antimikroba diberikan untuk mempersingkat berlangsungnya penyakit dan penyebaran bakteri. *Trimetoprim-sulfametoksazole* atau *fluoroquinolon* dua kali sehari selama 3 hari merupakan antibiotik yang dianjurkan. Antibiotik terpilih untuk infeksi *Shigella* adalah ampicilin. Kloramfenikol, sulfametoazol, trimethoprim. Beberapa sumber lain menyebutkan bahwa kanamisin, streptomisin dan neomisin merupakan antibiotik yang dianjurkan untuk kasus-kasus infeksi *Shigella*. Masalah resistensi kuman *Shigella* terhadap antibiotik dengan segala aspeknya bukanlah merupakan suatu hal yang baru. *Shigella* yang resisten terhadap antibiotik (seperti *Shigella dysenteriae*) ditemukan di seluruh dunia dan sebagai akibat pemakaian antibiotika yang tidak rasional.

E. Antibakteri

1. Definisi

Antibakteri merupakan bahan atau senyawa yang khusus digunakan untuk kelompok bakteri. Antibakteri dapat dibedakan berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu antibakteri yang menghambat pertumbuhan dinding sel, antibakteri yang mengakibatkan perubahan permeabilitas membran sel atau menghambat pengangkutan aktif melalui membran sel, antibakteri yang menghambat sintesis protein, dan antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel. Aktivitas antibakteri dibagi menjadi 2 macam yaitu aktivitas bakteriostatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen dalam spectrum luas) (Sahputra 2014).

2. Mekanisme kerja antibakteri

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok, yaitu yang mengganggu metabolisme sel mikroba, yang menghambat sintesis dinding sel mikroba, yang merusak membran sel mikroba, yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel mikroba (Ganiswara 2007).

2.1. Penghambatan metabolisme sel. Mikroba 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 benzoate (PABA) untuk kehidupannya. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional, sehingga kebutuhan asam folat tidak terpenuhi hal ini bisa menyebabkan bakteri mati. Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini ialah sulfonamide, trimethoprim, asam p-aminosalisilat, dan sulfon (Ganiswara 2007).

2.2. Penghambatan sintesis dinding sel. Mekanisme kerusakan dinding sel dapat disebabkan oleh adanya akumulasi komponen lipofilik yang terdapat pada dinding sel atau membrane sel sehingga menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel. Terjadinya akumulasi senyawa antibakteri dipengaruhi oleh bentuk terdisosiasi. Gugus hidrofobik pada senyawa antibakteri dapat mengikat daerah hidrofobik membran serta melarut baik pada fase lipid membran bakteri. Umumnya senyawa antimikroba dapat menghambat sintesis peptidoglikan karena kemampuan dari senyawa tersebut dalam menghambat enzim-enzim yang berperan dalam pembentukan peptidoglikan seperti karboksipeptidase, endopeptidase, dan transpeptidase. Jika aktivitas enzim-enzim tersebut dihambat oleh senyawa antibakteri maka sifat enzim autolitik sebagai reseptor hilang dan enzim tidak mampu mengendalikan aktivitasnya sehingga dinding sel akan mengalami degradasi (Maryuni 2008).

2.3. Penghambatan ketuhan membran sel. Selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, dapat meloloskan beberapa zat yang terlarut dan bahan zat-zat yang terlarut lainnya. Salah satu kerja antibakteri adalah mengubah tegangan permukaan sehingga merusak permeabilitas selektif dari membran sel

mikroba. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain. Obat yang termasuk kelompok ini ialah polimiksin, golongan polien serat berbagai antimikroba kemoterapi seperti antiseptic (Ganiswara 2007).

2.4. Penghambatan sintesis protein. Hidup suatu sel tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Suatu kondisi atau substansi yang mengubah keadaan ini, yaitu mendenaturasikan protein dan asam-asam nukleat dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu tinggi dan konsentrasi pekat beberapa zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi irreversibel komponen-komponen selular yang vital ini (Maryuni 2008).

2.5. Penghambatan sintesis asam nukleat. Antimikroba berkaitan dengan enzim polymerase-RNA (pada sub unit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Obat yang termasuk ini ialah rifampisin, dan golongan kuinolon (Ganiswara 2007).

3. Uji aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibiotik bertujuan untuk menetapkan potensi aktivitas antibakteri, konsentrasinya dalam cairan tubuh dan jaringan, dan kepekaan mikroorganisme terhadap agen antibakteri. Metode yang digunakan antara lain :

3.1. Metode difusi. *Disc diffusion metode (tes Kirby & Bauer)* untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut (Pratiwi 2008). Pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode agar dengan cara diberi lubang alat pencetak lubang. Tiap sumur pada permukaan agar telah diinokulasi mikroba dimasukkan larutan pengujian, kemudian diinkubasi pada suhu optimum untuk pertumbuhan mikroba (Rostina 2007).

Metode cakram (*tes Kirby & Bauer*) menggunakan piringan atau cakram yang berisi agen antimikroba, kemudian diletakkan pada media agar yang sebelumnya telah ditanami mikroorganisme sehingga agen antimikroba dapat

berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Pratiwi 2008).

Pengujian ini dapat dievaluasi ada atau tidaknya aktivitas antibakteri dengan melihat kemampuan ekstrak tersebut menghambat pertumbuhan bakteri pada media tersebut. Daerah hambat yang terbentuk ditunjukkan dengan lingkungan bening disekitar cakram yang berisi larutan uji (Rostina 2007).

Keuntungan dari metode difusi dibandingkan metode yang lain yaitu lebih ekonomis, sederhana, mudah dibuat, dan reproduksibel. Prosedur yang paling sering digunakan dan dianjurkan oleh WHO (*World Health Organization*) dan NCCLS (*Nation Committee for Clinical Laboratory Standards*) adalah metode difusi cakram modifikasi *Kirby Bauer*. Kelemahan metode ini karena tidak bisa digunakan untuk semua jenis mikroba misalnya mikroba dengan pertumbuhan lambat ataupun anaerob obligat (Depkes 1999).

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

Keuntungan metode ini adalah memberikan hasil kualitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al.* 1986), dan satu konsentrasi agen mikroba yang di ujikan dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi 2008). Kekurangan metode dilusi yaitu sampel yang digunakan harus jernih karena jika keruh akan mempersulit pengamatan (Putra 2010).

F. Mc Farland 0,5

Mc Farland 0,5 merupakan formula yang terdiri dari aop-0wsam belerang 1% dan Barium klorida 1%, dengan perbandingan 99,5 : 0,5. Mc Farland 0,5 disetarakan dengan 10^8 cfu/mL. Mc Farland dimaksudkan untuk menggantikan perhitungan bakteri satu per satu dan untuk memperkirakan kepadatan sel yang digunakan pada prosedur pengujian antimikroba. Penilaian kekeruhan dapat digunakan spektrofotometer atau nephelometer (Becton 2010).

Mc Farland 0,5 merupakan standar yang digunakan sebagai patokan jumlah bakteri pada metode agar dilusi, broth makro-mikro dilusi, metode disk difusi dan anaerobic tes. Mc Farland 0,5 adalah salah satu cara yang dapat diaplikasikan untuk menyiapkan bakteri yang akan digunakan untuk uji kemampuan antimikroba. Jenis Mc Farland lain yaitu seperti Mc Farland 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; dan 8,0 yang membedakan dengan Mc Farland 0,5 adalah perbandingan jumlah antara asam belerang 1% dan barium klorida 1% (Becton 2010).

G. Kromatografi Lapis Tipis

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

H. Media

1. Pengertian media

Media adalah substrat yang diperlukan untuk menumbuhkan dan mengembangkan mikroba. Media harus steril sebelum digunakan untuk penelitian, artinya tidak ditumbuhi oleh mikroba lain. Mikroba dapat tumbuh dan berkembang dengan baik dengan persyaratan tertentu, yaitu media harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba. Media juga harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba (Suriawiria 2005).

2. Jenis-jenis media pertumbuhan bakteri

2.1. Media sintetik. Media ini digunakan untuk menumbuhkan bakteri kemoheterotrof. Pada uji kadar vitamin secara mikrobiologis, media yang digunakan mengandung faktor pertumbuhan yang dibutuhkan oleh bakteri kecuali vitamin yang diuji. Pertumbuhan bakteri sebanding dengan kadar asam laktat yang dihasilkan bakteri akan sebanding dengan jumlah vitamin dalam bahan uji. Organisme yang banyak menimbulkan faktor pertumbuhan disebut *fastidious*, misalnya *Lactobacillus* (Radji 2011).

2.2. Media Kompleks. Media ini mengandung nutrisi tinggi, yang terdiri atas ekstrak ragi, ekstrak daging, tumbuhan, ataupun protein dari sumber lain. Vitamin, mineral, dan bahan organik diperoleh dari ekstrak daging atau ragi yang merupakan sumber nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Media kompleks yang berbentuk cairan disebut *nutrient broth*, sedangkan yang ditambahkan oleh media agar disebut *nutrient agar* (Radji 2011).

2.3. Media biakan khusus. Media ini digunakan untuk menentukan tipe pertumbuhan mikroba dan kemampuannya untuk mengadakan perubahan kimia tertentu. Bakteri aerob membutuhkan O₂ dengan konsentrasi lebih tinggi ataupun lebih rendah daripada konsentrasi CO₂ di udara (Radji 2011).

2.4. 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 digunakan untuk menekan pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan, contoh *Bismuth Sulfite Agar*

digunakan untuk mengisolasi bakteri *Salmonella typhi* pada tinja, media *Salmonella Shigella Agar* untuk mengisolasi bakteri *Staphylococcus aureus*, media *Pseudomonas Selektif Agar* untuk mengisolasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Media diferensial memudahkan perbedaan koloni bakteri yang diinginkan dari koloni lain yang tumbuh pada lempeng media yang sama (Radji 2011).

2.5. Media anaerob. Bakteri anaerob ditanam pada media spesial disebut reducing media yang menggunakan natrium tioglikolat. Media ini sebelum digunakan dipanaskan perlahan-lahan untuk menghilangkan oksigen yang terserap. Bejana anaerob digunakan untuk menginkubasi bakteri anaerob yang diinokulasikan dalam media agar di dalam cawan petri (Radji 2011).

2.6. Media pengayaan. Media ini dalam bentuk media cair bila digunakan untuk pengayaan biakan bakteri dan hampir sama dengan media selektif, tetapi dirancang untuk memperbanyak tipe bakteri yang diinginkan. Tahap pengayaan adalah upaya untuk menumbuhkan bakteri dalam beberapa kali pemindahan ke media yang baru. Ketika biakan pengayaan terakhir disebrakan di atas media padat yang mengandung komposisi yang sama dengan media cair, hanya koloni yang mampu menggunakan fenol yang bertahan tumbuh (Radji 2011).

I. Kotrimoksazol

Kotrimoksazol merupakan kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol digunakan dalam bentuk kombinasi karena sifatnya sinergistik. Trimetoprim dan sulfametoksazol menghambat reaksi enzimatik obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba. Spektrum antibakteri trimetoprim sama dengan sulfametoksazol. *Shigella* spesies merupakan salah satu mikroba yang peka terhadap kotrimoksazol.

Mekanisme antibakterinya berdasar atas kerjanya pada tahap yang berurutan dalam reaksi enzimatik untuk membentuk asam tetrahidrofolat. Sulfametoksazol menghambat masuknya molekul PABA ke dalam asam folat dan trimetoprim menghambat terjadinya reaksi reduksi dari dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat. Tetrahidrofolat penting untuk reaksi-reaksi pemindahan suatu

atom C, seperti pembentukan basa purin dan beberapa asam amino. Trimetoprim menghambat enzim dihidrofolat reduktase mikroba secara sangat selektif. Kombinasi ini mungkin efektif walaupun mikroba telah resisten terhadap trimetoprim. Sinergisme maksimum akan terjadi bila mikroba peka terhadap kedua komponen (Gunawan *et al.* 2009). Keuntungan penting lain dari kombinasi ini adalah timbulnya resisten lebih lambat daripada komponen-komponennya sendiri. Hal ini jelas, karena bakteri yang menjadi resistensi untuk satu komponen masih dapat dimusnahkan oleh yang lain (Tjay & Rahardja 2002).

J. Sterilisasi

Sterilisasi adalah tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Alat dan bahan dapat dikatakan steril apabila terbebas dari mikroba. Cara sterilisasi yang umum dilakukan antara lain sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan, penggunaan sinar X, dan penggunaan sinar UV (Suriawiria 2005).

Sterilisasi didefinisikan sebagai proses di mana semua mikroorganisme hidup, termasuk spora bakteri dibunuh. Sterilisasi dapat dilakukan dengan cara fisik, kimia, dan sarana fitokimia. Metode fisika menggunakan cahaya matahari, pemanasan, vibrasi, radiasi, dan filtrasi. Metode kimia yaitu berbahan cair (alcohol, aldehid, fenol, halogen, serta logam berat) dan gas (formaldehid dan etilen oksida). Sebuah metode fisikokimia merupakan penggabungan baik metode fisik dan kimia. Penggunaan steamformaldehid adalah metode sterilisasi fisikokimia (Rao 2008).

K. Landasan Teori

Disentri merupakan gangguan pencernaan yang menular, yang ditandai dengan peradangan usus, terutama usus besar. Penyakit ini ditandai dengan diare cair akut dan atau disentri (tinja bercampur darah, lender, dan nanah), pada umumnya disertai demam, nyeri perut, dan tenesmus (Khalili 2014).

Skринing aktivitas antimikroba pada anggota Amaranthaceae seperti ekstrak etanol bagian daun dan akar menunjukkan penghambatan spesifik terhadap bakteri gram positif *Streptococcus sp* (Salvador *et al.* 2002). Penelitian

lain pada tanaman dari keluarga *Amaranthus tricolor* L mengungkapkan bahwa ekstrak etanol 80% daun dan batang *Achyranthes aspera*, juga memiliki penghambatan spesifik terhadap dua bakteri gram positif, *B. subtilis* dan *S. Aureus* (Valsaraj *et al.* 1997) sedangkan metanol dan air ekstrak daun *Alternanthera brasiliensis*, yang dilaporkan penghambatan baik pada gram positif dan bakteri gram negatif pada 25 mg / ml (Coelho de Souza *et al.* 2004).

Menurut Latief (2012), daun bayam terkenal sebagai sayuran dengan sumber zat besi (Fe). Selain itu, bayam mengandung antioksidan, seperti karotenoid, polifenol, dan flavonoid (kuersetin). Saponin merupakan senyawa yang diduga sebagai senyawa antibakteri karena memiliki kemampuan dalam menghambat fungsi membran sel sehingga merusak permeabilitas membran yang mengakibatkan dinding sel rusak atau hancur (Ayuningtyas 2008). Senyawa flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Dewanti & Wahyudi 2011). Alkaloid dapat mengganggu terbentuknya jembatan seberang silang komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Ajizag 2004). Fenol merupakan senyawa dengan gugus – OH yang terikat langsung pada cincin aromatik. Senyawa fenol banyak terdapat di alam dan merupakan intermediet bagi industri untuk berbagai macam produk seperti adhesif dan antiseptik. Fenol dapat dipakai sebagai desinfektan (Siswoyo 2009).

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama, kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. n-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa nonpolar, misalnya golongan kandungan kimia minyak atsiri, lemak dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid, dan karotenoid (Tiwari *et al.* 2011). Etil asetat merupakan senyawa semi polar dan dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan triterpenoid (Putri *et al.* 2013). Air melarutkan glikosida, flavonoid, tanin, dan gula (Depkes 1986). Flavonoid dan polifenol pada penelitian sebelumnya diduga bisa memberikan efek laksatif. Komponen tersebut secara signifikan dapat

menambah pengeluaran feses dan menstimulasi motilitas saluran cerna (Jeevanandhan 2013). Ketiga fraksi tersebut dapat menarik senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam bayam merah yang berfungsi sebagai antibakteri.

Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas dari *Shigella dysenteriae* adalah metode difusi. Khasiat antibakteri ekstrak daun metanol *Amaranthus tricolor* diuji dengan metode difusi agar dengan baik (Bauer *et al.* 1966). Pada metode ini zat yang akan ditentukan aktivitas antimikrobanya berdifusi pada lempeng *Blood Agar Plate* yang telah ditanami mikroba yang akan diuji. Sebagai kontrol positif dalam penelitian ini dapat digunakan kotrimoksazol merupakan kombinasi trimethoprim dan sulfametoksazol yang menghambat reaksi enzimatis obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi kedua obat memberikan efek sinergi (Ganiswara 1995).

L. Hipotesis

Berdasarkan dari landasan teori dalam penelitian ini, disusun hipotesis antara lain :

Pertama, ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dari daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361.

Kedua, dari ketiga fraksi atau ekstrak etanol yang mempunyai aktivitas teraktif dalam menghambat *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 yaitu fraksi etil asetat.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) yang ditanam dan diambil secara acak di daerah Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan adalah daun bayam merah yang segar, bebas dari hama, berwarna merah dan tidak terlalu muda. Sampel diambil pada bulan Januari 2017.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama adalah uji aktivitas antibakteri. Ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.). Variabel utama kedua adalah *Shigella dysenteriae* ATCC 9361.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari 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 bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.).

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Shigella dysenteriae* ATCC 9361, kondisi laboratorium (meliputi: kondisi inkas, alat, dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, waktu panen, waktu pemilihan daun, dan metode ekstrak.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 yang dipengaruhi oleh ekstrak fraksi *n*-heksana,

fraksi etil asetat, fraksi air dari daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) pada media.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) adalah bagian daun dari tanaman bayam merah yang diperoleh dari daerah Karanganyar, Jawa tengah.

Kedua, serbuk daun bayam merah adalah serbuk yang diperoleh dari daun bayam merah yang sudah dicuci bersih dengan air yang mengalir, dikeringkan dengan oven suhu 40°C, selanjutnya diserbuk dan diayak dengan pengayak nomor 40. Ekstrak etanol daun bayam merah adalah hasil maserasi daun bayam merah dengan menggunakan pelarut etanol 70%

Ketiga, fraksi *n*-heksana adalah ekstrak hasil maserasi kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana.

Keempat, fraksi etil asetat daun bayam merah didapat dari residu ekstrak etanol daun bayam merah dengan *n*-heksana yang kemudian difraksinasi dengan pelarut etil asetat

Kelima, fraksi air daun bayam merah adalah residu dari hasil fraksinasi fraksi etil asetat.

Keenam, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Shigella dysenteriae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

Ketujuh, uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol terhadap daun bayam merah terhadap *Shigella dysenteriae* ditunjukkan dengan mengukur diameter zona hambat kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri sebesar 10-20 mm dengan metode difusi. Antibakteri harus mendapatkan kontak langsung dengan media agar. Luas daerah hambat adalah daerah jernih di sekeliling semuran yang tidak ditumbuhi bakteri.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah meliputi blender, oven, *Moisture Balance*, timbangan analitik, corong kaca, , evaporator, gelas ukur (pyrex), kaca kaki tiga, labu takar, labu Erlenmeyer (pyrex), autoklaf, *deck glass*,

obyek glass, mikroskop, inkas, jarum ose, kapas lidi steril, pembakar spirtus, pinset, pipet ukur 1 ml, rak tabung, penangas air, selang, tabung reaksi, cawan petri, dan *boor prop*.

2. Bahan

Pertama, sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) yang diambil secara acak daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

Ketiga, medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah, *Brain Heart Infusion* (BHI), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Kliger Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Nutrien Agar* (NA), *Vogel Johnson Agar* (VJA)

Keempat, bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut etanol 70%, *n*-heksana, dan etil asetat yang berguna untuk melarutkan dan menarik senyawa kimia yang terkandung dalam bayam merah.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi daun bayam merah

Determinasi tumbuhan dalam tahap penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel tumbuhan daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mencocokkan morfologi yang ada pada tanaman bayam merah. Determinasi dilakukan di bagian unit Laboratorium Morfologis Sistematis Tumbuhan Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bayam merah tanaman bayam merah yang diambil daun yang segar, bersih, dan baik yang tidak mengandung penyakit dikumpulkan pada wadah yang bersih.

3. Pengeringan dan pembuatan serbuk daun bayam merah

Daun bayam merah dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran dan cemaran, kemudian ditiriskan, dan dioven pada suhu 50°C selama 48 jam, di

belnder, diayak dengan nomor 40. Hasil pembuatan serbuk yang berupa serbuk kering disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat yang selanjutnya akan digunakan untuk penelitian.

4. Penetapan kadar lembab dalam serbuk daun bayam merah

Penetapan kadar lembab daun bayam merah dilakukan menggunakan alat *Moizture balance*. Pengukuran dilakukan dengan cara ditimbang serbuk daun bayam merah sebanyak 2 gram kedalam alat *Moizture balance*, pengukuran memerlukan waktu sekitar 20 menit, pengukuran dihentikan dengan ditandai adanya bunyi tertentu, ditekan tombol fungsi persen untuk mengetahui presentase kadar lembab terukur.

5. Pembuatan ekstrak etanol 70% daun bayam merah

Daun bayam merah yang telah diserbuk 500g dimasukkan ke dalam bejana kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak dengan perbandingan 10:75. Campuran tersebut didiamkan selama 5 hari dengan sesekali digojog. Filtrat dengan ampas dipisahkan dengan menggunakan kain flanel. Filtrat yang didapat kemudian dipekatkan dengan *Vacum Rotatory evaporator* dengan suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental daun bayam merah.

6. Uji bebas etanol ekstrak daun bayam merah

Ekstrak yang telah pekat diuji sudah bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Hasil positif bebas etanol jika tidak tercium bau ester yang khas dari etanol.

7. Identifikasi kandungan kimia serbuk daun bayam merah

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk mengetahui kandungan kimia yang terkandung dalam serbuk daun bayam merah. Identifikasi senyawa flavonoid, saponin, alkaloid, dan polifenol dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

7.1. Flavonoid. 2 mg serbuk simplisia ditambah 5 ml akuades dipanaskan selama 1 menit, disaring, dan diambil filtratnya. Filtrat ditambah 0,1 gram serbuk Mg, 2 ml larutan alkohol : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran ini dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan

dengan warna merah atau kuning atau jingga pada amil alkohol (Tarigan *et al.* 2008).

7.2. Alkaloid. 0,5 gram serbuk ditambah dengan sedikit larutan HCl 2 N, dipanaskan kemudian ditambahkan larutan Mayer terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dan dengan Dragendrof terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, maka ada kemungkinan terdapat alkaloid (Depkes 2000).

7.3. Saponin. Serbuk 0,5 g dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan air panas 10 ml, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji positif bila terbentuk buih yang mantap setinggi 1-10 cm. pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang (Tarigan *et al.* 2008).

7.4. Polifenol. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah dengan 10 ml air panas. Setelah dingin ditambahkan 3 tetes FeCl₃. Ekstrak mengandung polifenol jika terbentuk warna hijau, biru, ungu, hitam, atau endapan merah yang kuat (Depkes 1979).

8. Pembuatan fraksi n-heksana daun bayam merah secara fraksinasi

Ekstrak etanol daun bayam merah 10 gram yang telah disuspensikan dengan air difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana 75 mL menggunakan corong pisah. Fraksi *n*-heksana merupakan filtrat yang terletak di atas. Sedangkan fraksi air merupakan filtrat yang terletak di bawah. Fraksi *n*-heksana dipisahkan dari fraksi air. Fraksi *n*-heksana yang didapat kemudian dipekatkan pada *Vacuum Rotatory evaporator* pada suhu 40°C. fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana dilakukan sebanyak 3 kali.

9. Pembuatan fraksi etil asetat daun bayam merah secara fraksinasi

Fraksi air sisa dari fraksi *n*-heksana, kemudian difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat menggunakan corong pisah. Fraksi etil asetat merupakan filtrat yang terletak di atas, sedangkan fraksi air merupakan filtrat yang terletak di bawah. Fraksi etil asetat yang didapat kemudian dipekatkan dengan *Vacuum Rotatory evaporator* pada suhu 40°C. Fraksinasi dengan pelarut etil asetat dilakukan sebanyak 3 kali.

10. Pembuatan fraksi air secra fraksinasi.

Filtrat sisa fraksinasi dengan pelarut etil asetat adalah fraksi air. Fraksi air terbentuk dibagian paling bawah. Filtrat dikentalkan dengan waterbath sampai kental denga suhu yang stabil.

11. Sterilisasi alat dan bahan

Bahan atau peralatan yang digunakan harus dalam keadaan steril. Cawan petri, pipet tabung reaksi, labu Erlenmeyer, Beaker glass, dan gelas ukur disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 150-170°C selama 30-60 menit. Alat penanam bakteri (ose/sengkelit) disterilkan dengan pembakaran, yaitu dengan membakarnya sampai pijar dengan lampu spirtus. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-30 menit.

12. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 dalam biakan murni diambil masing-masing satu ose dan kemudian dimasukkan ke tabung yang telah diisi 10 ml media BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi yang didapat 1 ose dimasukkan dalam 10 ml BHI dan distandarkan dengan Mc Farland 0,5. Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah sel bakteri (Bonang & Koeswardono 1982).

13. Identifikasi bakteri uji

13.1. Identifikasi bakteri secara goresan. Identifikasi bakteri uji *Shigella dysenteriae* ATCC 9361, biakan *Shigella dysenteriae* diinkubasi pada media selektif *Salmonella Shigella Agar* (SSA) dan diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Penampakan koloni yang terjadi yaitu kecil, halus, tidak berwarna, tepi, dan permukaan rata (Jawetz et al. 1986).

13.2. Identifikasi bakteri uji secara biokimia. Identifikasi berdasarkan uji biokimia dengan menggunakan media SIM, KIA, LIA, dan *Citrat*.

13.2.1. Media SIM (*Sulfida Indol Motility*). Biakan murni diinokulasi pada permukaan media dengan cara diinokulasi tusukan kemudian diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif bila media berwarna hitam, uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah

ditambah dengan reagen Erlich A dan B, uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media. Hasil uji SIM pada *Shigella* yaitu *Sulfida* (-), *Indol* (+), *Motility* (-).

13.2.2. Media KIA (*Kliger Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+). Hasil uji KIA pada *Shigella* yaitu K/A S(-).

13.2.3. Media LIA (*Lysine Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasi tusukan dan goresan kemudian diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi berfungsi untuk menguji lisin dan sulfida. Selanjutnya diamati bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna coklat (ditulis R), berwarna ungu (ditulis K), berwarna kuning (ditulis A), serta terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+). Hasil uji LIA pada *Shigella* yaitu K/A S(-).

13.2.4. Media Citrat. Biakan bakteri diinokulasi goresan kemudian diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru (Jawtz et al. 1986). Hasil uji citrat pada *Shigella* yaitu (-).

14. Pengujian antibakteri secara difusi

Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Metode difusi menggunakan cawan petri steril yang telah diisi dengan media MHA diinkubasi dengan bakteri *Shigella dysenteriae* yang dioleskan sampai rata dan didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi kedalam media, kemudian dibuat sumuran dengan menggunakan *boor prop* sebanyak 5 sumur dengan jarak yang sama masing-

masing sumuran diisi sebanyak 50 μ l dengan fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dengan konsentrasi yang berbeda yang telah diencerkan dengan DMSO 10% yaitu 25%, 50%, 75%, 100% serta kontrol positif, kontrol negatif dan ekstrak daun bayam merah. Jumlah bakteri yang digunakan disesuaikan dengan Standard MC Farland 0,5. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk pertumbuhan mikroba. Pengukuran diameter zona hambat yang ada disekitar sumuran dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri sekitar sumuran menandakan bahwa kandungan kimia daun bayam merah memiliki daya hambat terhadap *Shigella dysenteriae*. Pengujian dilakukan sebanyak 5 kali

15. Kromatografi lapis tipis

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat pada fraksi teraktif daun bayam merah. Fraksi yang paling aktif diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi yang dinyatakan paling aktif ditotolkan menggunakan pipa kapiler di atas lempeng kromatografi. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) mula-mula dilakukan dengan cara menaikkan cairan pengembang (fase gerak) di dalam suatu bejana (chamber) yang didindingnya telah dilapisi dengan kertas saring sehingga atmosfer di dalam bejana dijenuhi dengan fase gerak kemudian dilakukan elusi sampai fase gerak mencapai batas elusi. Pengembangan yang sudah dilakukan dilanjutkan dengan pengeringan lempeng kromatografi lapis tipis, kemudian dilakukan deteksi di bawah sinar UV dan pereaksi lainnya. Bercak yang didekteksi ditentukan harga R_f dan penampakan warnanya.

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

15.2. Identifikasi alkaloid. Senyawa alkaloid diidentifikasi menggunakan KLT yaitu fase diam yang digunakan yaitu silica gel GF₂₅₄ dan fase geraknya

CHCl₃ : etanol (96:4). Kemudian dideteksi di bawah sinar UV₂₅₄ sehingga akan memberikan warna coklat kehitaman dan UV₃₆₆ berwarna hijau. Pereaksi semprot yang digunakan yaitu dragendorf (Budiman *et al.* 2010).

15.3. Identifikasi saponin. Identifikasi saponin menggunakan kromatografi lapis tipis, fase diam yang digunakan yaitu silica gel GF₂₅₄ dan fase geraknya yaitu kloroform : methanol : aquades (13:7:2). Kemudian dideteksi di bawah sinar UV₂₅₄ sehingga akan memberikan warna gelap dan UV₃₆₆ berwarna hijau. Lempeng juga disemprotkan dengan pereaksi LB (*Lieberman Bourchat*) dan dipanaskan pada suhu 110°C selama 10 menit untuk memperjelas warna noda yang terbentuk (Suharto *et al.* 2012).

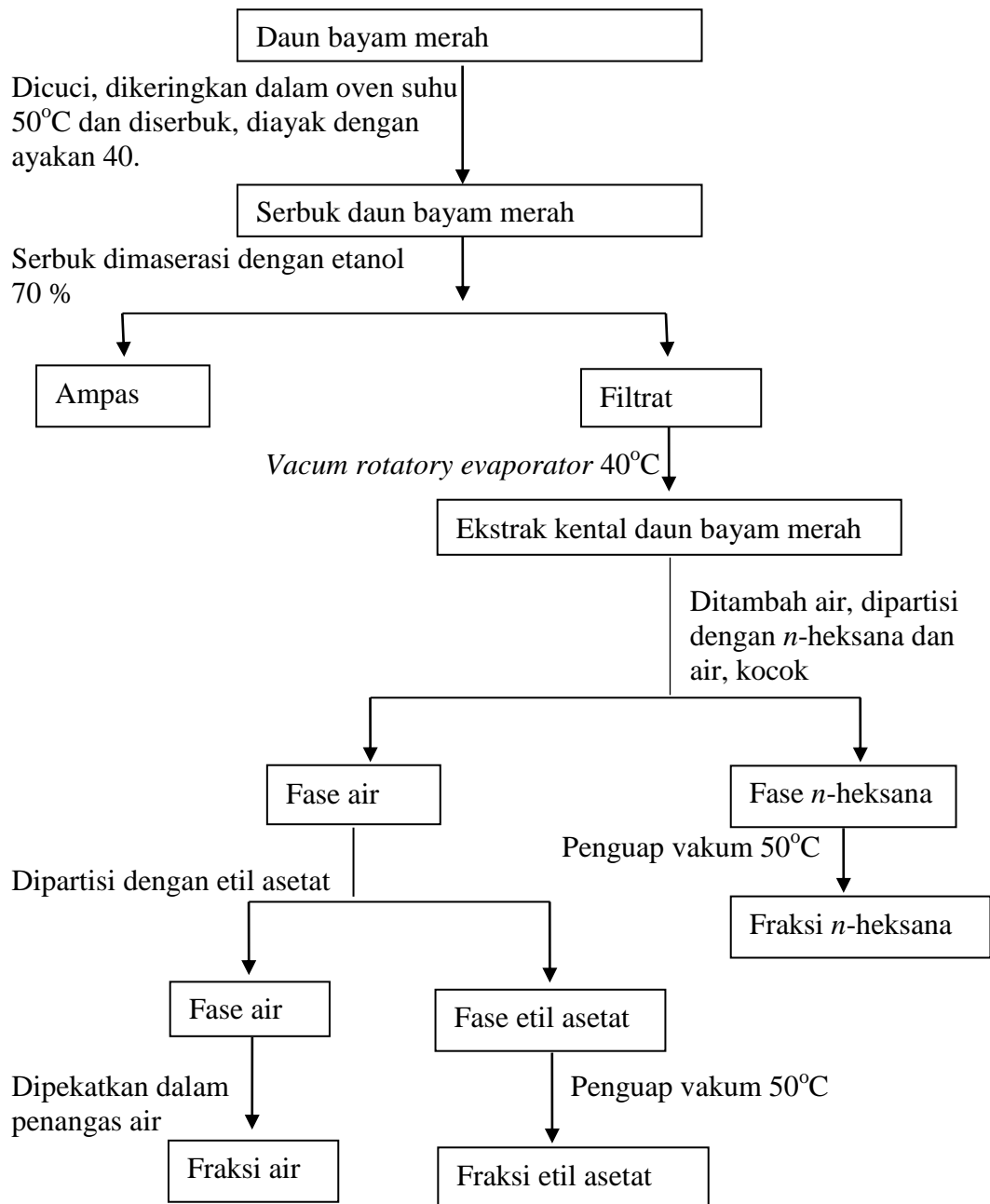
15.4. Identifikasi polifenol. Fase gerak yang digunakan etil asetat : methanol (1:1) dan ditambah asam formiat 1 tetes. Pereaksi penampak yang digunakan FeCl₃. Pereaksi ini akan membuat polifenol membentuk warna biru kehitaman (Harbone 1987).

E. Pengamatan Hasil

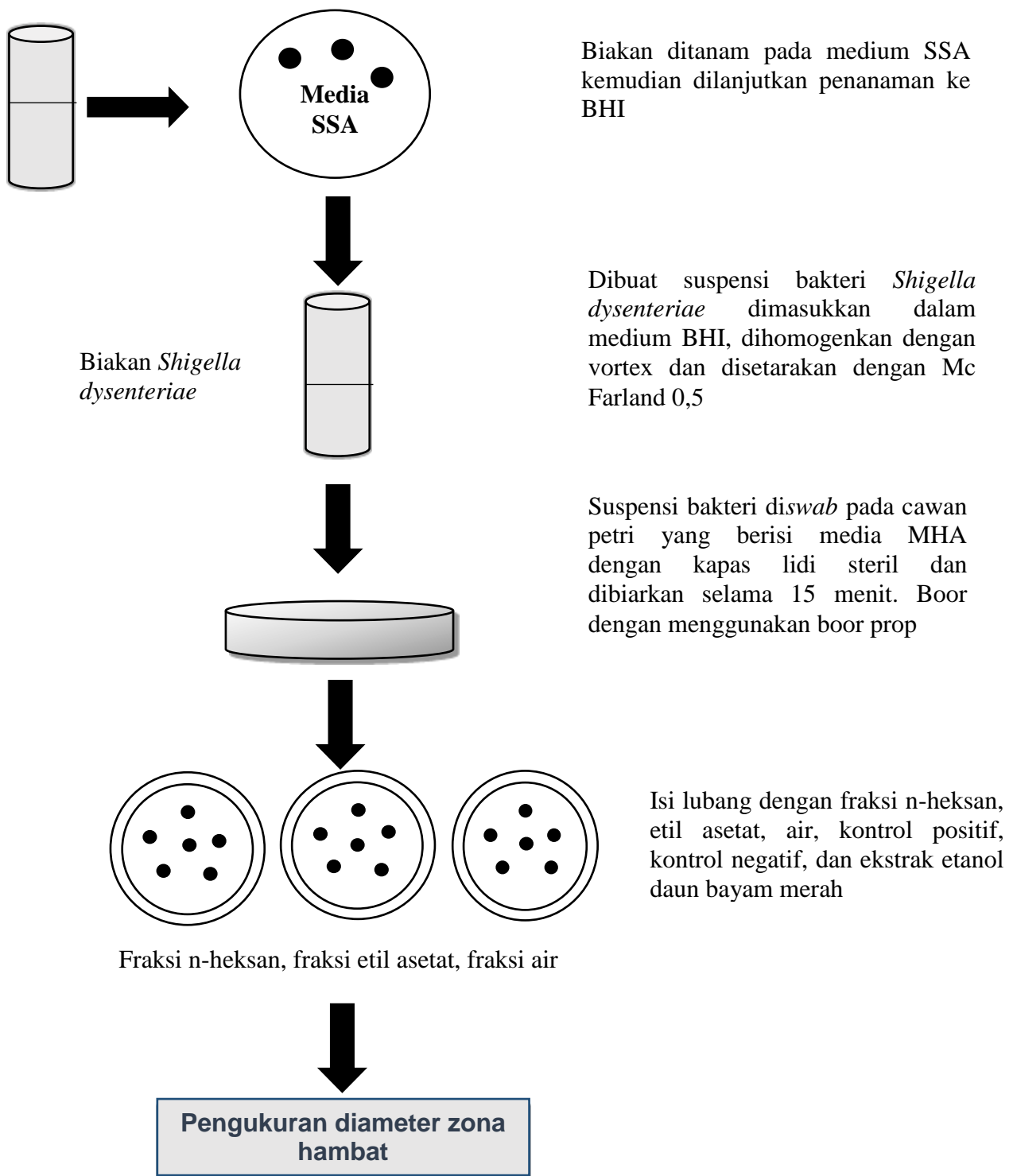
Pembacaan hasil dilakukan setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dengan melihat zona transparan (radikal) disekitar sumuran. Daerah bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lainnya yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat dihitung dalam satuan millimeter (mm) menggunakan penggaris. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan Davis dan Stout dalam Aryadi (2014), yaitu sebagai berikut :

- a. Diameter zona bening 20 mm atau lebih artinya daya hambat sangat kuat.
- b. Diameter zona bening 10-20 mm artinya daya hambat kuat.
- c. Diameter zona bening 5-10 mm artinya daya hambat sedang.
- d. Diameter zona hambat 2-5 mm artinya daya hambat lemah.

F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun bayam merah.



Gambar 2. Skema pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian Daun Bayam Merah

1. Determinasi tanaman bayam merah

Determinasi daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta. Berdasarkan hasil determinasi dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini benar-benar daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L). Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan digunakan sebagai objek penelitian dengan cara mencocokkan ciri-ciri tanaman yang tercantum dalam literatur, untuk menghindari kesalahan dalam mengumpulkan bahan dan menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Hasil dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) yang diambil secara acak di daerah Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel diambil pada bulan Januari 2017.

3. Pembuatan serbuk daun bayam merah

Daun bayam merah yang telah dicuci bersih dengan air mengalir sampai terbebas dari butiran debu. Daun bayam merah dikering anginkan (tanpa terkena sinar matahari langsung). Proses pengeringan dimaksudkan mengurangi kadar air untuk mencegah terjadinya pembusukkan yang disebabkan oleh jamur dan bakteri, mencegah perubahan kimiawi yang dapat menurunkan mutu serbuk, serta mempermudah penggerusan atau pembuatan serbuk.

Daun bayam merah 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 bayam merah dapat dilihat pada table 1. Pengeringan daun bayam merah

Daun bayam merah yang sudah kering kemudian digiling lalu diayak dengan ayakan no 40. Bobot basah sebanyak 3500 gram diperoleh bobot kering

sebesar 640 gram. Persentase rata-rata bobot kering terhadap bobot basah daun bayam merah sebesar 18,28% b/b. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 1. Hasil rendemen daun kering terhadap daun basah

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
3500	680	18,28

4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun bayam merah

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan *Moisture Balance*. Hasil penetapan susut kering dapat dilihat pada table 2.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar air serbuk daun bayam merah

No	Berat serbuk (g)	Kadar (%)
1	2,00	6,00
2	2,00	7,60
3	2,00	6,50
	Rata-rata	6,70

Hasil penetapan susut pengeringan daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) didapatkan rata-rata sebesar 6,70%. Susut pengeringan memenuhi syarat dimana serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%, karena dengan kadar air kurang dari 10% sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tidak tumbuh sehingga bahan lebih awet (Katno dkk. 2008).

5. Identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun bayam merah

Serbuk dan ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) yang didapat diuji kandungan kimia yang terkandung di dalamnya, untuk membuktikan kebenarannya diuji sebagai berikut :

Tabel 3. Hasil identifikasi kandungan kimia daun bayam merah

No	Kandungan kimia	Interprestasi hasil				
		Serbuk	Ekstrak	Fraksi		
				n-heksana	Etil asetat	Air
1	Flavonoid	+	+	+	-	-
2	Alkaloid	+	+	+	+	+
3	Saponin	+	+	+	+	+
4	Polifenol	+	+	-	-	-

Keterangan :
 + : ada mengandung senyawa
 - : tidak ada mengandung senyawa

Hasil gambar identifikasi senyawa kimia serbuk, fraksi dan ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) dapat dilihat pada lampiran 6 dan 7. Identifikasi kandungan kimia terhadap serbuk dan ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam daun bayam merah dengan menggunakan tabung reaksi. Berdasarkan table 3 dapat dilihat bahwa hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol daun bayam merah positif mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, dan polifenol, dimana senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas antibakteri.

6. Pembuatan ekstrak etanol daun bayam merah

Metode pembuatan ekstrak pada penelitian ini dengan menggunakan cara maserasi karena pengerjaan dan peralatannya yang sederhana. Maserasi lebih menguntungkan untuk metabolit yang tidak tahan panas karena cara ini tanpa pemanasan sehingga tidak menyebabkan terjadinya degradasi dari metabolit tersebut (Depkes 2000). Cairan penyari yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan etano 70%. Serbuk dari simplisia daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) yang digunakan untuk pembuatan ekstrak sebanyak 600 gram. Proses maserasi dilakukan dalam keadaan tertutup menggunakan wadah gelap dan terhindar dari sinar matahari langsung. Data hasil pembuatan ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) dapat dilihat pada table 4. Hasil perhitungan persen rendemen ekstrak etanol daun bayam merah dapat dilihat dilampiran 11.

Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak etanol daun bayam merah

Berat serbuk (g)	Etanol (ml)	Berat ekstrak kental (g)	Rendemen (%b/b)
600	4500	110	18,33

7. Uji bebas etanol ekstrak daun bayam merah

Ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) 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 bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) positif bebas etanol karena tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol. Tujuan dilakukan uji bebas etanol pada ekstrak daun bayam merah adalah untuk mencegah kesalahan pengamatan dalam tahap penelitian selanjutnya yaitu pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* sebab etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian ini.

8. Fraksinasi ekstrak daun bayam merah

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, begitu juga senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar dan juga dengan senyawa semi polar akan masuk ke pelarut semi polar (Harbone 1987). 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 akan digunakan dalam penelitian. Perhitungan persen rendemen fraksi eter, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) dapat dilihat di lampiran 11. Data hasil pembuatan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun bayam merah dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 5. Rendemen hasil fraksi n-heksana, etil asetat, dan air.

Ekstrak etanol (gram)	Pelarut	Hasil Fraksi (gram)	Rendemen (%)
110	n-heksana	9,78	8,89
	Etil asetat	17,25	15,68
	air	39,95	36,31

Berdasarkan table 5 dapat dilihat bahwa perhitungan prosentase rata-rata rendemen fraksi n-heksana daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) didapat 8,89%, fraksi etil asetat daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) didapat 15,68%, dan fraksi air daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) didapat 36,31%.

Hasil fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibandingkan fraksi yang lain karena sebagian besar senyawa dalam daun bayam merah bersifat polar. Rendemen setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) berbeda. Hasil rendemen yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu 100% atau mendekati 100%. Hal tersebut kemungkinan disebabkan ekstrak yang menempel pada wadah, corong pisah dan kurangnya kekentalan ekstrak untuk proses fraksinasi serta kurang rapatnya alat yang digunakan sehingga ada beberapa yang tertumpah.

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

Identifikasi kandungan kimia dengan uji kromatografi lapis tipis (KLT) hnay dilakukan pada fraksi etil asetat karena fraksi ini mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361. Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui beberapa senyawa antibakteri yang terkandung pada fraksi etil asetat yaitu alkaloid dan saponin.

Hasil identifikasi senyawa alkaloid dengan menggunakan KLT yaitu fase diam silika gel GF 254 dan fase geraknya menggunakan toluene : etil asetat : dietilamin (7:2:1) dengan pereaksi semprot yang digunakan yaitu dragendrof. Dibawah sinar UV 254 bercak berwarna coklat kehitaman dan UV 366 berwarna hijau dengan nilai Rf sebesar 0,5.

Hasil identifikasi senyawa saponin dengan menggunakan KLT fase diam yaitu silica gel GF254 dan fase geraknya yaitu etil asetat : kloroform : air : asam formiat Liebermann-Burchard (LB). Secara visual dengan pereaksi semprot LB memberikan warna merah dengan Rf sebesar 0,81. Hasil perhitungan dan gambar dapat dilihat pada lampiran 13.

B. Hasil Identifikasi Antibakteri

1. Pembuatan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361

Bakteri uji *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 dalam biakan murni diambil masing-masing 2 ose kemudian dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril yang telah diisi BHI (*Brain Heart Infusion*) cair sebanyak 10 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dipipet 0,01 ml dimasukkan dalam 10 ml BHI sehingga didapat kekeruhan yang sama dengan standar *McFarland* 0,5.

2. Identifikasi bakteri uji *Shigella dysenteriae* ATCC 9361

2.1. Inokulasi *Shigella dysenteriae*. Identifikasi *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 yang diinokulasi pada medium *Salmonella Shigella Agar* (SSA) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil goresan menunjukkan koloni kecil, halus, konveks, dan permukaan rata.

2.2. Identifikasi *Shigella dysenteriae* secara pengecatan Gram. Identifikasi *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 secara morfologi dengan metode pewarnaan Gram pada mikroskop dengan perbesaran kuat (1000x) akan nampak berwarna merah, berbentuk batang, hal ini membuktikan bahwa bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri gram negatif. Pada pengecatan Gram oleh Gram A, bakteri Gram negatif menyerap warna ungu kebiruan dari kristal violet. Dilanjutkan pengecatan Gram B yang menguatkan afinitas cat terhadap sel bakteri. Bakteri Gram negatif, membran luar (lipoprotein) bersifat nonpolar sedangkan alkohol-asam pada Gram C juga bersifat nonpolar sehingga saat bertemu dengan Gram C akan larut berdasarkan prinsip *dissolved like*. Prinsip ini menunjukkan bahwa zat yang memiliki kelarutan sama akan saling melarutkan. Karena hal tersebut, maka membran luar pada bakteri Gram negatif hilang sehingga hanya menyisakan peptidoglikan yang tipis dan warna Kristal violet

hilang. Hal tersebut menyebabkan ekstraksi lipid dan memperbesar permeabilitas dinding sel sehingga pewarnaan safranin (Gram D) masuk ke dalam sel dan menyebabkan sel menjadi berwarna merah. Hasil gambar dapat dilihat pada lampiran 8.

2.3. Hasil identifikasi *Shigella dysenteriae* secara biokimia. Identifikasi uji biokimia *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 berdasarkan pustaka dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Identifikasi uji biokimia *Shigella dysenteriae* ATCC 9361

Pengujian	Hasil	Pustaka (Jawetz <i>et al.</i> 2012)
SIM	-+-	-+-
KIA	K/A S(-)	K/A S(-)
LIA	K/A S(-)	K/A S(-)
Citrat	-	-

Pengujian *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 pada media SIM menunjukkan (-+-) yaitu *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 tidak dapat mereduksi thiosulfate sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide sehingga tidak berwarna hitam, indol positif karena bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 menghasilkan enzim tryphanase yang mengubah tryptophan menjadi indol ditambah asam piruvat dan NH₃. Indol beraksi dengan reagen erlich membentuk warna merah dan motilitas negative karena pertumbuhan bakteri hanya dibekas tusukan.

Pengujian pada media KIA memberikan hasil bagian lereng berwarna merah, dasar berwarna kuning dan medium tidak berwarna hitam S(-). *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 menguraikan glukosa dan tidak menguraikan laktosa. Dasar terbentuk warna kuning, karena *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 memfermentasi glukosa yang bersifat asam. Medium tidak terbentuk warna hitam karena tidak memproduksi hydrogen sulfide, menghasilkan gas karena memfermentasi glukosa menjadi asam.

Pengujian pada LIA diperoleh hasil bagian lereng berwarna ungu karena bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 mendekarboksilase lisin sehingga menyebabkan reaksi basa, dasar berwarna kuning karena bakteri mendeaminasi

lisin dan tidak membentuk warna hitam S (-) karena tidak memproduksi hydrogen sulfide.

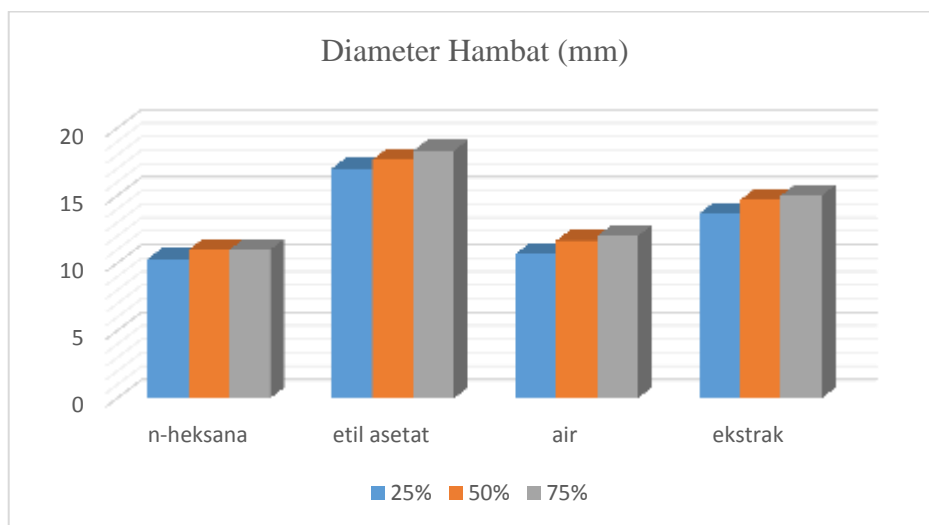
Pengujian pada media citrat negatif berwarna hijau, yang berarti *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Hasil gambar dapat dilihat pada lampiran 8.

3. Hasil pengujian efek antibakteri ekstrak etanol fraksi n-heksana, eter dan air daun bayam merah secara difusi

Hasil ekstrak etano fraksi n-heksana, eter, dan air daun bayam merah dilakukan pengujian antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361. Konsentrasi terendah dari fraksi dapat menunjukkan akan daerah jernih yang merupakan daerah zona hambat aktivitas bakteri.

Tabel 7. Hasil uji difusi dari ekstrak etanol fraksi n-heksana, etil asetat dan air daun bayam merah terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Bahan uji	Konsentrasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata	±SD
		Replikasi				
		1	2	3		
n-heksana	25%	10	10	11	10,33	0,57
	50%	11	12	10	11	1,00
	75%	10	13	10	11	1,73
Etil asetat	25%	16	17	18	17	1,00
	50%	18	18	17	17,67	0,57
	75%	19	18	18	18,33	0,57
Air	25%	11	11	10	10,67	0,57
	50%	12	13	10	11,67	1,52
	75%	11	12	13	12	1,00
Ekstrak	25%	13	14	14	13,67	0,57
	50%	14	15	15	14,67	0,57
	75%	14	15	16	15	1,00
Antibiotik	Kotrimoksazole	28	29	28	28,33	0,57
DMSO	10%	-	-	-	-	-



Gambar 3. Grafik diameter hambatan

Luas area zona hambatan pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 dapat dilihat pada area jernih pada media MHA, dimana pada hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai aktivitas paling aktif, pada konsentrasi yaitu 75% mempunyai daerah zona hambatan rata-rata 18,33 mm \pm SD 0,57. Hal ini juga ditunjukkan pada fraksi etil asetat konsentrasi 50% sudah dapat memberikan nilai SD sama dengan konsentrasi 75% yaitu \pm SD 0,57.

Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun bayam merah dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid saponin, tannin, polifenol, dan triterpenoid (Putri *et al.* 2013), yang mana pada daun bayam merah sendiri terkandung senyawa alkaloid, saponin, flavonoid dan polifenol. Senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat yaitu terdapat alkaloid dan saponin. Senyawa tersebut mempunyai aktivitas masing-masing dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa saponin pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Saponin bersifat spermisida, antimikroba, antiperadangan, dan memiliki aktivitas sitotoksik (Tjay & Rahardja 2002). Senyawa alkaloid sebagai antibakteri dilakukan dengan menggunakan komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel pada bakteri tersebut (Alamsyah & Kurniawan).

Kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui apakah pelarut memiliki potensi menghambat atau membunuh bakteri. Kontrol negatif yang digunakan

adalah pelarut DMSO 10% yang tidak memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri uji karena tidak terbentuk zona bening di sekitar cakram maka zona hambat atau zona bunuh yang terbentuk tidak ada pengaruh dari pelarut. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah kotrimoksazol. Antibiotik kotrimoksazol dipilih untuk pengujian daya antibakteri karena efek sinergis dari trimethoprim dan sulfametoksazol menghambat reaksi enzimatik obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi ini merupakan kemajuan penting dalam usaha meningkatkan efektivitas klinik antimikroba.

Pengujian statistika menggunakan uji Anova dengan klasifikasi satu arah (*One Way Anova*) dengan tingkat kemaknaan 95% atau $\alpha=0,05$. Sebelum dilakukan uji anova satu arah terlebih dahulu dilakukan uji Kolmogorov-Smirnov. Fungsi uji ini adalah menguji normalitas data dan mensyaratkan data penelitian tersebut terdistribusi normal jika akan menggunakan Anova. Kriteria uji Kolmogorov-Smirnov adalah bila *Asymp. Sig.* lebih dari 0,05 maka terdistribusi normal. Data tabel didapatkan nilai *Asymp. Sig.* sebesar 0,064. Nilai ini lebih besar dari 0,05 maka dapat disimpulkan data penelitian uji efektivitas antibakteri ini terdistribusi normal.

Setelah diketahui terdistribusi normal kemudian dilakukan uji Levene Statistic. Fungsi uji ini adalah mengetahui homogenitas data dengan kriteria $p>0,05$. Data tabel didapatkan nilai *Sig.* sebesar 0,093. Nilai ini lebih besar dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data tersebut homogen atau memiliki variansi yang sama.

Selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan antara ekstrak daun bayam merah pada masing-masing konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Kriteria ujinya adalah diameter zona hambat dalam berbagai konsentrasi yang dimiliki dinyatakan ada perbedaan yang nyata (signifikan) dengan tingkat kemaknaan $\alpha=0.05$, bila nilai signifikan (*Sig.*) lebih kecil dari 0.05, namun sebaliknya jika tidak ada perbedaan yang nyata (signifikan) bila nilai Signifikansi (*Sig.*) lebih besar dari 0.05. Dalam tabel didapatkan nilai signifikansinya sebesar 0.000. nilai ini lebih kecil dari 0.05 maka dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan diameter

zona hambatan dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75%.Selanjutnya hasil uji anova terdapat perbedaan diameter daerah hambat maka dilakukan *uji post hoc* Student Neuman Keuls - LSD untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda dan konsentrasi yang mempunyai aktivitas antibakteri paling baik. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat diketahui perbedaan antara kelompok yang satu dengan kelompok yang lainnya dengan melihat nilai sig. (*p*). Perbedaan kelompok yang signifikan diperoleh nilai sig<0.05. hasil menunjukkan bahwa ekstrak daun bayam merah dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% memiliki nilai sig >0,05. Pada fraksi yang menunjukkan diameter hambat terbesar adalah pada fraksi etil asetat dengan nilai SD yang mana tidak berbeda secara nyata antara konsentrasi 50% dan 75%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pada fraksi etil asetat menggunakan konsentrasi 50% telah merupakan konsentrasi paling aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Hasil penelitian aktivitas antibakteri ekstrak daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 dapat disimpulkan:

1. Ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dari daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* ATCC 9361
2. Dari ketiga fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri paling aktif dalam menghambat *Shigella dysenteriae* ATCC 9361 adalah fraksi etil asetat dengan konsentrasi yang paling efektif yaitu pada konsentrasi 50% dengan diameter zona hambat kuat seberar 17,67 mm.

B. Saran

1. Perlu dilakukan uji toksisitas untuk menguji tingkat dosis yang aman digunakan sebagai pengobatan alami menggunakan daun bayam merah.
2. Perlu dilakukan penyebaran informasi mengenai manfaat dari bahan alami, khususnya daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L) sebagai salah satu obat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan *shigella dysenteriae* ATCC 9361 sebagai terjadinya diare.
3. Perlu dilakukan uji aktivitas antibakteri daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) dengan menggunakan spesies bakteri patogen yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Alamsyah, Heru Kurniawan. 2014. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Sargassum cinereum* (J.G.Agardh) dari Perairan Pulau Panjang Jepara terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermidis**. Semarang : Universitas Diponegoro. Vol 3. No 2. Hal 69-78
- Arias, Kathleen Meehan. 2003. *Investigasi dan Pengendalian Wabah di Fasilitas Pelayanan Kesehatan*. Jakarta: EGC
- Aryadi, I.G.A.I.P., 2014. *Pengaruh Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Sebagai Penyebab Abses Periodontal Secara in Vitro*. Skripsi, Denpasar: Kedokteran Gigi, Universitas Mahasaraswati Denpasar.
- Aziz., et.al. 2011. *Screening of selected Malaysian plants against several food borne pathogen bacteria*. *International Food Research Journal* 18(3): 1195-1201 (2011)
- Budiman, H.,& Styawan, A. A., 2010. Pengaruh Penurunan Dosis dari Ekstrak Etanol Batang Brotowali (*Tinospora crispa*, L) Terhadap Efek Antipiretik pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *CERATA Jurnal Ilmu Farmasi*. Vol. 1 (1) : 29-41.
- Becton, Dickinson and Company. 2010. *BBL Prepared Turbidity Standart Mc Farland Turbidity Standart No. 0,5*. USA :7 Loveton Circle Sparks, MD 21152
- Bonang Gerhard, S. Enggar dan koeswardono, 1982, *Mikrobiologi Kedokteran* , P.T Gramedia, Jakarta.
- Coelho de Souza, G., Haas, A. P. S., von Poser, G. L., Schapoval, E. E. S., and Elisabetsky, E. 2004. *Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil*. *Journal of Ethnopharmacology* 90: 135-143.
- Dalimarta S. 2000. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia* Jilid 2. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jilid 1. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal 3-6
- Depkes RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan: Jakarta.

- Dinas Kesehatan Kota Sibolga. 2014. *Profil Kesehatan Puskesmas Pintu Angin Kota Sibolga Tahun 2014*. Sibolga: Dinkes Sibolga.
- Fatimah S. 2009. *Studi kadar klorofil dan zat besi (Fe) pada beberapa jenis bayam terhadap jumlah eritrosit tikus putih (Rattus Norvegicus) anemia* [Skripsi]. Malang: Fakultas sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Farouq. 2003. *Ekstrak sebagai Salah Satu Pengembangan Bantuk Obat Tradisional*. Seminar POKJANAS YOI XXIII. Universitas Pancasila, Jakarta. Hal. 12.
- Ganiswara S.G. (eds). 2007. *Farmakologi dan Terapi*. 5th ed. Gaya Baru : Jakarta. Hal :523-536
- Gunawan D dan Mulyani S 2004. *Ilmu Obat Alam. Jilid I*. Jakarta: Penebar Swadaya. hlm 9-13
- Goodman & Gilman. 2007. *Dasar Farmakologi Terapi*. . editor; Hardman G Joel, Limird E Lee, editor bahasa Indonesia. Jakarta: EGC. Terjemahan dari: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics*.
- Harborne, J. B., 2006, *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, terjemahan K. Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung, hal. 47-51, 76, 78
- Harborne. JB. 1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan kedua. Bandung: ITB Bandung. Hal 6-7.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah; Bandung: ITB Bandung. hlm 6, 151. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*
- Harun H., 2009, *Uji Daya Antimikroba Ekstrak Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L.) Terhadap Bakteri Shigella dysenteriae*
- Indraswari, A. (2008). *Optimasi Pembuatan Ekstrak Daun Dewan Daru (Eugenia Uniflora L.) Menggunakan Metode Maserasi dengan Paramater Kadar Total Senyawa Fenolik dan Flavonoid*. Surakarta: Tugas Akhir Teknik Kimia Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Istiqomah.(2013). *Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (Piperis retrofracti fructus)*. Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Jakarta: Universitas Islam negeri Syarif Hidayatullah. Halaman 11-14, 21

- Jawetz E, 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Diterjemahkan oleh Gerard dan Bonang. Jakarta: Buku Kedokteran.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, dan Ornston LN, 1996. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 20*. Jakarta: EGC. Alih bahasa: Edi Nugroho & Maulany RF.
- Jawetz E, Melnick JL.,J.L.,E.A., 2005, *Medical Microbiologi*, 23nd. Ed. Elferia Nr, Penerjemah : Jakarta
- Jeevanandhan Somasundaram. 2013. Evaluation of Laxative Effect of Ethanol Extract of Leaves of *Annova Muricata* L. *International Journal of Innovative Drug Discovery* : Vol 3 / Issue 1/ 2013 / 28-32.
- Katno dkk.2008. *Pengaruh waktu Pengeringan terhadap Kadar Tanin Daun Jati Belanda (Guazuma ulmifolia Lamk.) Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia. Vol. 1 No. 1.*
- Kementrian Kesehatan RI. (2011). *Situasi Diare di Indonesia*. Jakarta: Jendela Datinkes
- Kusmiati, Tiah, R., Ayu, A. P., 2014, ‘*Pengujian Ekstrak Aseton Daun Bayam (Amaranthus sp) sebagai Senyawa ANtiradikal DPPH, antibakteri, dan Identifikasi Senyawa Aktif dengan KG SM*’, Seminar Nasional Biologi, Jakarta, Vol. 11 No. 1
- Latief, Abdul. 2012. *Obat Tradisional*. Jakarta: EGC
- Lenny S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenil Propanioda, Alkaloid*, Medan: USU Repository
- Marliana, Soerya Dewi., Venty Suryanti., Suyono. 2006. *Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (Sechium Edule Jacq. Swartz.) Dalam Ekstrak Etanol*. Biofarmasi 3 (1): 26-31
- Maryuni, Agnes Eri. 2008. *Isolasi dan Identifikasi Antibakteri Minyak Atsiri Daun Zodia (Evodia sp.)*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Ma'mun, S., *et.al.* 2006. *Teknik Pembuatan Simplisia Dan Ekstrak Purwoceng*. Laporan Teknis Penelitian TA 2006. Balitro.
- Noer HMS, Waspadji S, Rachman AM, Lesmana LA, Widodo D, Isbagio H, Alwi I, Husodo UB. 1996. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Ed ke- 3. Jakarta: PAPDI. hlm: 458-459

- Putri W.S. Warditiani N.K, Larasanty, L.P.F. 2013. *Skrining fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (Garcinia Mangosta L). Jurnal Farmasi.* Universitas Udayana.
- Prasetyo dan Inorih, E. 2013. *Pengelolaan Budidaya Tanaman Obat-Obatan (Bahan Simplisia).* Badan Penerbitan Fakultas Pertanian UNIB, Bengkulu. Halaman: 17-25
- Prastowo, Eko Andri. 2013. *Standarisasi Simplisia.* Surabaya : Universitas Airlangga
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi.* Terjemahan Oleh padmawinata. Bndung: Penerbit ITB.
- Radji, M., 2011, *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*, 107, 118, 201-207, 295, Jakarta, Buku Kedokteran EGC.
- Robinsosn, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi.* Penerbit ITB. Bandung.
- Saparinto, C. 2013. *Grow Your Own Vegetables-Panduan Praktis Menanam 14 Sayuran Konsumsi Populer di Pekarangan.* Penebar Swadaya. Yogyakarta. 180 hlm
- Salvador, M. J., Ferreira, E. O., Pral, E. M. F., Alfieri, S. C., Albuquerque, S., Ito, I. Y., and Dias, D. A. 2002. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae). *Phytomedicine* 9: 566-571.
- Sowjanya Pulipati^{1*}, Srinivasa Babu P.1 and Lakshmi Narasu M. *Phytochemical analysis and antibacterial efficacy of Amaranthus tricolor (L) methanolic leaf extract against clinical isolates of urinary tract pathogens.* Vol. 9(20)
- Suharto, M. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Saponin dari Ekstrak Metanol Batang Pisang Ambon (*Musa paradisiacavar. sapientum L.*). *Jurnal Farmasi*, Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado
- Sunarjono, H. 2014. *Bertanam 36 Jenis Sayuran.* Penebar Swadaya.Jakarta. 204 hlm.
- Suriawiria, U. 2005. *Mikrobiologi Dasar.* Papas Sinar Sinanti, Jakarta
- Suryono B. 2009. *Bakteriologi Umum dan Bakteriologi Klinik.* Kediri: Akademi Analis Kesehatan Bhakti Jaya

- Suryono. 1995. *Bakteriologi Umum dan Bakteriologi Klinik*. Kediri: Akademi Analisis Kesehatan Bhakti Wiyata
- Stahl E. 2008. *Analisa Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopis*. Terjemahan dari: Padmawinanto K, Sudiro L. Bandung: Penerbit ITB.
- Styawan, A. A., & Budiman, H., 2010. Pengaruh Penurunan Dosis dari Ekstrak Etanol Batang Brotowali (*Tinospora crispa*, L) Terhadap Efek Antipiretik pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *CERATA Jurnal Ilmu Farmasi*. Vol. 1 (1) : 29-41
- Tambayong, 2000, *Patofisiologi untuk Keperawatan*, EGC, Jakarta.
- Tambayong, Jan. 2000. *Mikrobiologi Untuk keperawatan*. Jakarta: Widya Medika.
- Tan dan Kirana. 2007. *Obat – Obat Penting Khasiat, Penggunaan dan Efek – Efek Sampingnya* Edisi ke 6. Jakarta: PT Elek Media Komputindo.
- Tarigan, J., C.F.Zuhra & H. Sihotang. 2008. *Skrining fitokimia tumbuhan yang digunakan oleh pedagang jamu gendong untuk merawat kulit wajah di Kecamatan Medan Baru*. *J. Biologi Sumatra* 1(3): 1-6.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur G. & Kaur H., 2011, Phytochemical Screening And Extraction: A Review, *International Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 98-106
- Tjay TH dan Rahardja K. 2002. *Obat-obat Penting. Edisi I*. Jakarta : Depkes, hlm 195-203
- Todar, K., 2009. *Bacillus anthracis and Antrax*. Todar's online textbook of bacteriology. *Science Magazine*, 429-450
- Trihardjana, 2007, *Kajian Potensi Diuretika Dari Beberapa Jenis Tanaman Di Sekitar Rumah*. Jurdik Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.
- World Health Organization (WHO), 2005, *Guidelines For The Control Of Shigellosis, Including Epidemics Due To Shigella dysenteriae type 1*, WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland, p. 12 - 15.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat keterangan melakukan Identifikasi/determinasi tanaman



No : 152/DET/UPT-LAB/27/III/2017
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Dellany Sarianggari
NIM : 19133814 A
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Bayam merah (*Amaranthus tricolor*)**

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

1b – 2b – 3b – 4b – 12b – 13b – 14b – 17b – 18b – 19b – 20b – 21b – 22b – 23b – 24b – 25b
– 26b – 27b – 799b – 800b – 801b – 802b – 806b – 807b – 809b – 810b – 811b – 825b –
826b – 829b – 830b – 831b – 832b – 833b – 834b – 835a – 836a – 837c – 851b – 856b –
857b – 872b – 875b – 876b – 877b – 886b – 895a – 896a – 898b – 908b – 913b – 915b.
familia 48. Amaranthaceae. 1a – 2b – 3b – 5b – 6a. 4. *Amaranthus* 1b – 3a. ***Amaranthus tricolor***

Deskripsi :

Habitus : Herba, tegak, tinggi 0,4 – 1 m.

Akar : Tumpang.

Batang : Percabangan monopodial, merah, berair, lemah.

Daun : **Tunggal, bulat telur, panjang 5,1 – 7,2 cm, ujung tumpul, pangkal runcing, tepi rata, warna merah.**

Bunga : Bunga majemuk, bulir, tepala 3.

Pustaka : Backer C.A. & Brink R.C.B. (1965): *Flora of Java* (Spermatophytes only).
N.V.P. Noordhoff – Groningen – The Netherlands.

Surakarta, 27 Maret 2017

Tim determinasi

Dra. Karimah Wiryosoendjojo, SU.

Lampiran 2. Foto tanaman dan serbuk daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L)



Daun bayam merah



Serbuk bayam merah

Lampiran 3. Foto alat Moisture Balance



Moisture Balance

Lampiran 4. Foto alat evaporator









Alat evaporator

Lampiran 5. Foto Fraksinasi



Proses fraksinasi

Lampiran 6. Foto identifikasi senyawa serbuk dan ekstrak daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L)

Hasil Identifikasi	
Serbuk	Ekstrak
 <p>Flavonoid (+)</p>	 <p>Flavonoid (+)</p>
 <p>Saponin (+)</p>	 <p>Saponin (+)</p>
 <p>Alkaloid (+)</p>	 <p>Alkaloid (+)</p>



Polifenol (+)



Polifenol (+)

Identifikasi serbuk dan ekstrak

Lampiran 7. Identifikasi senyawa fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L)

Hasil Identifikasi	
Fraksi n-heksana	 <p>Flavonoid, Alkaloid, Saponin, Polifenol</p>
Fraksi etil asetat	 <p>Polifenol, Saponin, Alkaloid, Flavonoid</p>
Fraksi Air	 <p>Flavonoid, Alkaloid, Saponin, Polifenol</p>

Identifikasi senyawa pada fraksi

Lampiran 8. Foto hasil identifikasi bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361



Pengecatan Gram



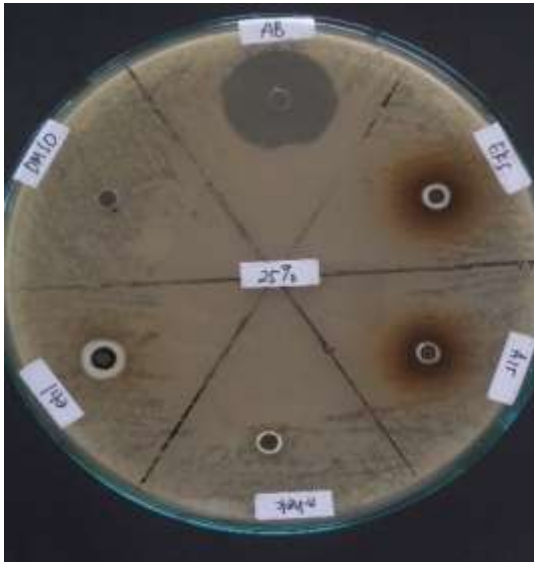
Bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361



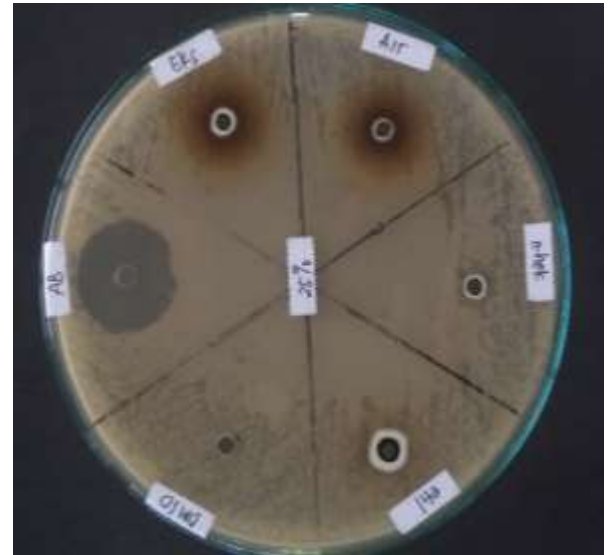
Uji Biokimia

Lampiran 9. Foto hasil pengujian Antibakteri Metode Difusi

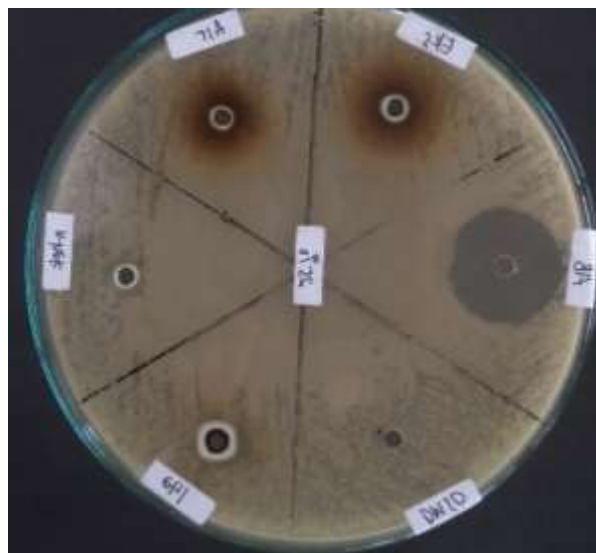
- Konsentrasi 25 %



Replikasi 1



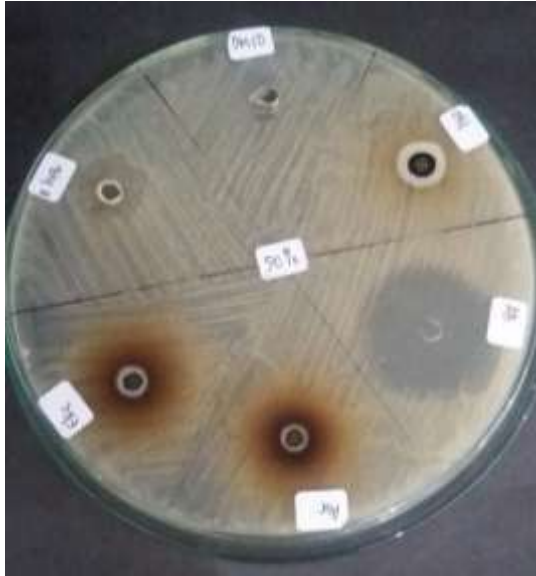
Replikasi 2



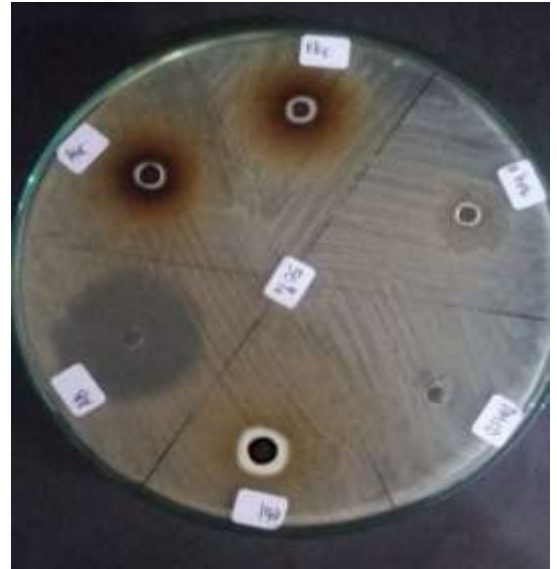
Replikasi 3

Pengujian antibakteri konsentrasi 25%

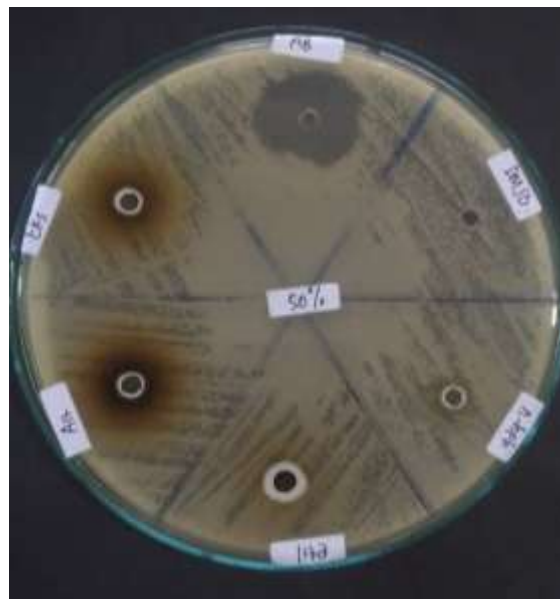
Konsentrasi 50%



Replikasi 1



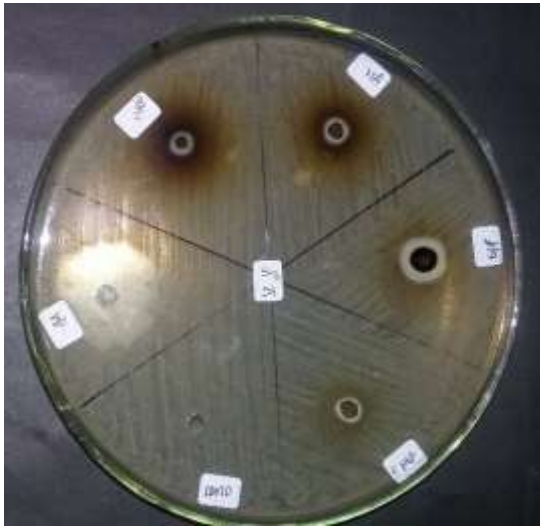
Replikasi 2



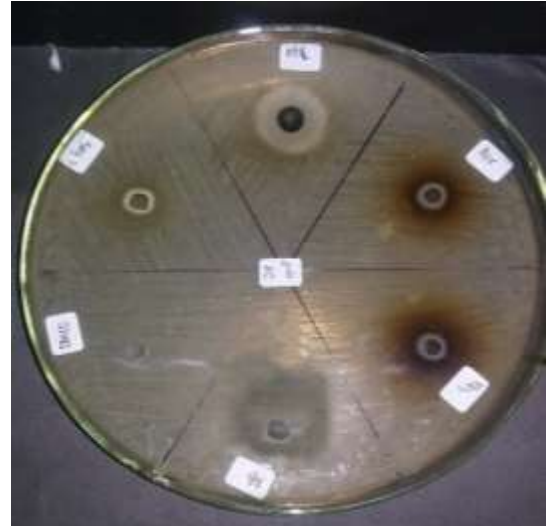
Replikasi 3

Pengujian antibakteri konsentrasi 50%

- Konsentrasi 75%



Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3

Pengujian antibakteri konsentrasi 75%

Lampiran 10. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
3500	680	18,28

$$\begin{aligned} \text{Rendemen serbuk} &= \frac{\text{bobot kering}}{\text{bobot basah}} \times 100 \% \\ &= \frac{680 (g)}{3500 (g)} \times 100 \% \\ &= 18,28 \% \end{aligned}$$

Lampiran 11. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan daun bayam merah

Prosentase bobot ekstrak maserasi daun bayam merah

Berat serbuk (g)	Etanol (ml)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%b/b)
600	4500	110	18,33

$$\begin{aligned} \text{Rendemen serbuk} &= \frac{\text{bobot kering}}{\text{bobot basah}} \times 100 \% \\ &= \frac{110 (g)}{600 (g)} \times 100 \% \\ &= 18,33 \% \end{aligned}$$

Rendemen fraksi n-heksana, etil asetat, dan air daun bayam merah

Ekstrak etanol (gram)	Pelarut	Hasil Fraksi (gram)	Rendemen (%)
110	n-heksana	9,78	8,89
	Etil asetat	17,25	15,68
	air	39,95	36,31

Rendemen fraksi n-heksana daun bayam merah

$$\begin{aligned} \text{Rendemen fraksi n-heksana} &= \frac{\text{bobot kering}}{\text{bobot basah}} \times 100 \% \\ &= \frac{9,78 (g)}{110 (g)} \times 100 \% \\ &= 8,89 \% \end{aligned}$$

Rendemen fraksi etil asetat daun bayam merah

$$\begin{aligned} \text{Rendemen fraksi etil asetat} &= \frac{\text{bobot kering}}{\text{bobot basah}} \times 100 \% \\ &= \frac{17,25 (g)}{110 (g)} \times 100 \% \\ &= 15,68 \% \end{aligned}$$

Rendemen fraksi air daun bayam merah

$$\begin{aligned} \text{Rendemen fraksi air} &= \frac{\text{bobot kering}}{\text{bobot basah}} \times 100 \% \\ &= \frac{39,95 (g)}{110 (g)} \times 100 \% \\ &= 36,31 \% \end{aligned}$$

Lampiran 12. Pembuatan larutan uji pada metode difusi

- Pembuatan larutan uji dengan konsentrasi 75% b/v sebanyak 2 ml

$$\begin{aligned} \text{Gram Ekstrak} &= \frac{75}{100} \times 2 \text{ml} \\ &= 1,5 \text{ gram} \end{aligned}$$

Menimbang 1 gram ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi eter, dan fraksi air yang diperoleh dilarutkan ad 2 ml DMSO

- Pembuatan larutan uji dengan konsentrasi 50% b/v

$$\begin{aligned} V_1 \times C_{75\%} &= V_{2\text{ml}} \times C_{50\%} \\ V_1 \times 75 &= 2 \times 50 \\ V_1 &= 1,3 \sim 1 \text{ ml} \end{aligned}$$

Mengambil 1 ml larutan uji konsentrasi 75% kemudian dilarutkan dengan 2 ml DMSO

- Pembuatan larutan uji dengan konsentrasi 25% b/v

$$\begin{aligned} V_1 \times C_{50\%} &= V_{2\text{ml}} \times C_{25\%} \\ V_1 \times 50 &= 2 \times 25 \\ V_1 &= 1 \text{ ml} \end{aligned}$$

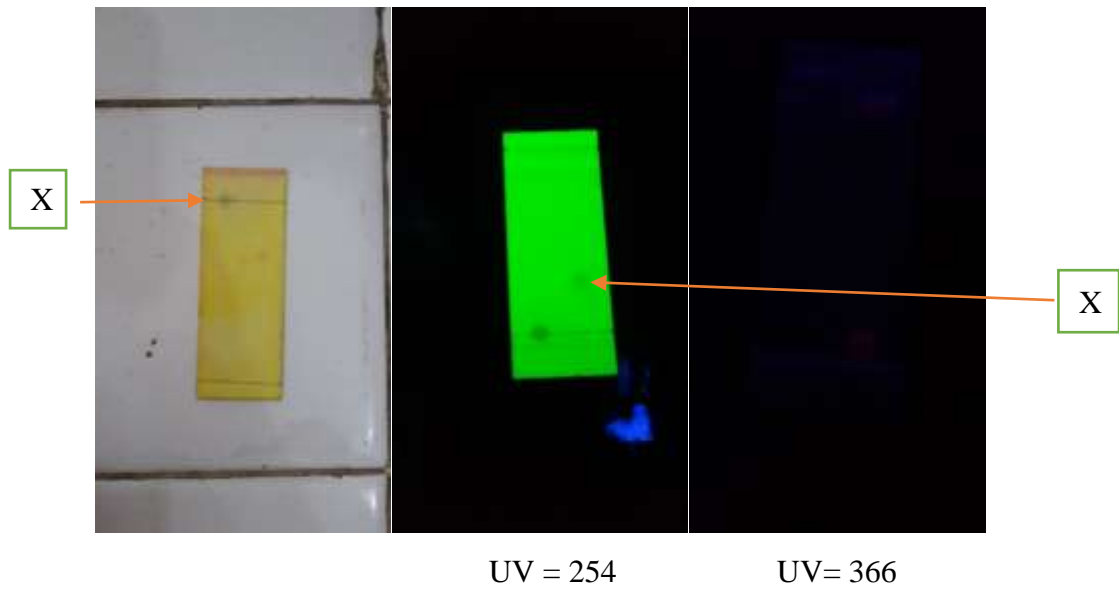
Mengambil 1 ml larutan uji 50% kemudian dilrutkan dengan 2 ml DMSO

Lampiran 13. Perhitungan Rf

$$R_f = \frac{\text{jarak bercak dari awal larutan}}{\text{jarak efusi}}, \text{ X : bercak}$$

a. Alkaloid

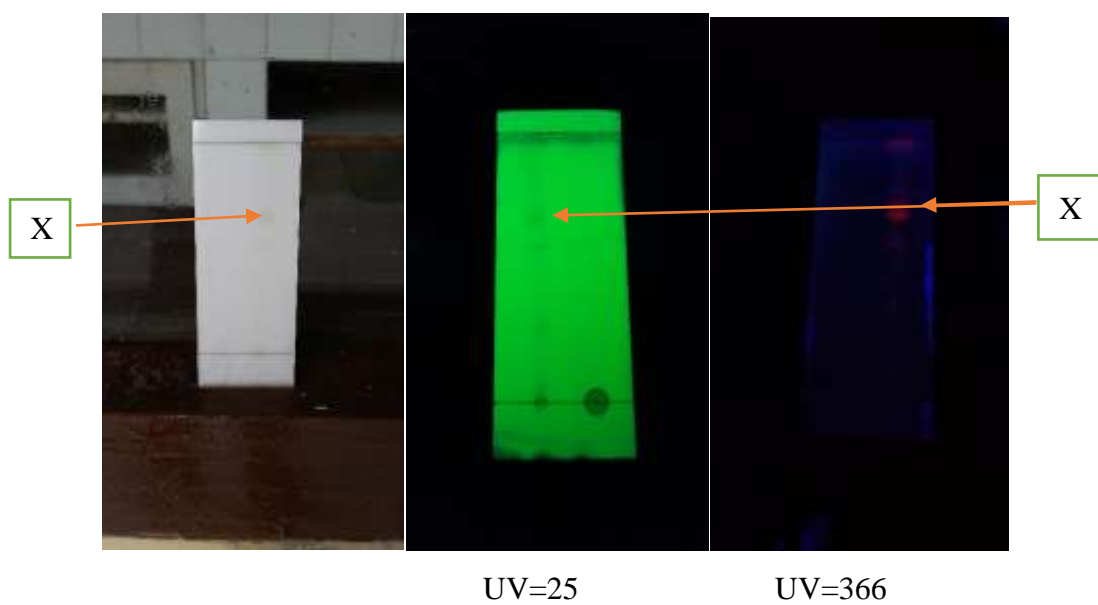
$$R_f = \frac{4}{8} = 0,5$$



Hasil pengujian KLT

b. Saponin

$$R_f = \frac{6,5}{8} = 0,81$$



Lampiran 14. Formulasi dan pembuatan media

a. Formulasi dan Pembuatan Media *Muller Hinton Agar* (MHA)

- Meat Infusion	1,0 gram
- Casein hydroysate	1,0 gram
- Starch	5.0 gram
- Agar-agar	12,0 gram
- pH	7,4 ± 0,2

Cara pembuatan :

1. Ditimbang bahan Mueller Hinton Agar 11,4 gram
2. Dimasukkan ke dalam *Beaker glass* kemudian ditambah dengan aquadest steril sebanyak 300 ml.
3. Dipanaskan hingga larut kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi masing-masing 10 ml.
4. Ditungkup dengan kapas lalu disterilkan dengan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
5. Didinginkan sampai suhu ± 50°C kemudian dituang ke dalam cawan petri steril
6. Setelah dingin, medium padat dibungkus dengan kertas dan disimpan dalam kulkas.

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

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

Cara Pembuatan :

1. Ditimbang bahan BHI sebanyak 0,74 gram

2. Dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian ditambah aquadest steril sebanyak 20 ml
3. Dipanaskan hingga larut kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi masing-masing 10 ml
4. Ditutup dengan kapas disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
5. Disimpan dalam kulkas

c. Formulasi dan Pembuatan Media *Salmonella Shigella Agar* (SSA)

- Lab lemco powder	5,0 gram
- Peprone	5,0 gram
- Lactoce	10,0 gram
- Bile salts	8,5 gram
- Sodium citrate	10,0 gram
- Sodium thiosulphate	8,5 gram
- Ferric citrate	1,0 gram
- Brilliant green	0,00033 gram
- Neutral red	0,0025 gram
- Agar	15,0 gram
- pH	7,0
- Aquadest	1000 ml

Cara pembuatan :

1. Ditimbang bahan SSA
2. Dimasukkan dalam beaker glass, kemudian ditambahkan aquadest steril sebanyak 1000 ml
3. Dipanaskan hingga larut dan digoyangkan sampai homogen, lalu dituang ke dalam cawan petri steril.
4. Setelah dingin, medium padat dibungkus dengan kertas dan disimpan dalam kulkas.

d. Formulasi dan Pembuatan *Kliger Iron Agar* (KIA)

- Peptone from Casein	15,0 gram
- Peptone from meat	5,0 gram

- Meat extract	3,0 gram
- Yeast extract	3,0 gram
- Sodium choride	5,0 gram
- Laktosa	10,0 gram
- Glukosa	1,0 gram
- Ammonium iron (III) citrate	0,5 gram
- Sodium thiosulfate	0,5 gram
- Phenol red	0,024 gram
- Agar-agar	12,0 gram
- pH	7,4 ± 0,2

Cara pembuatan :

1. Ditimbang bahan KIA 1,1 gram
2. Dimasukkan ke dalam *Beaker glass* kemudian ditambah dengan aquadest steril sebanyak 20 ml.
3. Dipanaskan hingga larut
4. Ditutup dengan kapas lalu disterilkan dengan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
5. Tabung diletakkan pada posisi miring sampai mengeras.
6. Setelah dingin, medium padat dibungkus dengan kertas dan disimpan dalam kulkas.

e. Formulasi dan Pembuatan *Sulfida Indol Motility* (SIM)

- Peptone from casein	20,0 gram
- Peptone from meat	6,0 gram
- Ammonium iron (III) citrate	0,2 gram
- Sodium thiosulfate	0,2 gram
- Agar-agar	3,0 gram
- pH	7,3 ± 0,2

Cara pembuatan :

1. Ditimbang bahan SIM 0,3 gram
2. Dimasukkan ke dalam *Beaker glass* kemudian ditambah dengan aquadest steril sebanyak 10 ml.

3. Dipanaskan hingga larut
4. Ditungkup dengan kapas lalu disterilkan dengan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
5. Tabung diletakkan pada posisi tegak sampai mengeras.
6. Setelah dingin, medium padat dibungkus dengan kertas dan disimpan dalam kulkas.

f. Formulasi dan Pembuatan Citrate Agar

- Ammonium hydrogen fosfat	1,0 gram
- Di-potassium hydrogen fosfat	1,0 gram
- Sodium chloride	5,0 gram
- Sodium citrate	2,0 gram
- Magnesium sulfate	0,2 gram
- Bromo thymol blue	0,08 gram
- Agar-agar	12,5 gram
- pH	7,0 ± 0,2

Cara pembuatan :

1. Ditimbang bahan Citrate 0,46 gram
2. Dimasukkan ke dalam *Beaker glass* kemudian ditambah dengan aquadest steril sebanyak 20 ml.
3. Dipanaskan hingga larut
4. Ditungkup dengan kapas lalu disterilkan dengan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
5. Tabung diletakkan pada posisi miring sampai mengeras.
6. Setelah dingin, medium padat dibungkus dengan kertas dan disimpan dalam kulkas.

g. Formulasi dan Pembuatan *Lysine Iron Agar (LIA)*

- peptone from meat	5,0 gram
- Yeast extract	3,0 gram
- D(+)- Glucosa	1,0 gram
- L-Lysine monohydrochloride	10,0 gram
- Sodium thiosulfate	0,04 gram

- Ammonium iron (III) citrate	0,5 gram
- Bromocresol purple	0,02 gram
- Agar-agar	12,5 gram

Cara pembuatan :

1. Ditimbang bahan LIA 0,64 gram
2. Dimasukkan ke dalam *Beaker glass* kemudian ditambah dengan aquadest steril sebanyak 20 ml.
3. Dipanaskan hingga larut
4. Ditutup dengan kapas lalu disterilkan dengan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
5. Tabung diletakkan pada posisi miring sampai mengeras.
6. Setelah dingin, medium padat dibungkus dengan kertas dan disimpan dalam kulkas.

Lampiran 15. Uji statistika

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
diameterhambat	42	13.6429	6.05995	.00	29.00

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		diameterhambat
N		42
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	13.6429
	Std. Deviation	6.05995
	Absolute	.202
Most Extreme Differences	Positive	.141
	Negative	-.202
Kolmogorov-Smirnov Z		1.312
Asymp. Sig. (2-tailed)		.064

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

diameterhambat

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
ekstrak 75%	3	15.0000	1.00000	.57735	12.5159	17.4841	14.00	16.00
ekstrak 50%	3	14.3333	.57735	.33333	12.8991	15.7676	14.00	15.00
ekstrak 25%	3	13.6667	.57735	.33333	12.2324	15.1009	13.00	14.00
fraksi n-heksan 75%	3	11.0000	1.73205	1.00000	6.6973	15.3027	10.00	13.00
fraksi n-heksan 50%	3	11.0000	1.00000	.57735	8.5159	13.4841	10.00	12.00
fraksi n-heksan 25%	3	10.3333	.57735	.33333	8.8991	11.7676	10.00	11.00
fraksi etil asetat 75%	3	18.3333	.57735	.33333	16.8991	19.7676	18.00	19.00
fraksi etil asetat 50%	3	17.6667	.57735	.33333	16.2324	19.1009	17.00	18.00
fraksi etil asetat 25%	3	17.0000	1.00000	.57735	14.5159	19.4841	16.00	18.00
fraksi air 75%	3	12.0000	1.00000	.57735	9.5159	14.4841	11.00	13.00
fraksi air 50%	3	11.6667	1.52753	.88192	7.8721	15.4612	10.00	13.00
fraksi air 25%	3	10.6667	.57735	.33333	9.2324	12.1009	10.00	11.00
kotrimoksazol	3	28.3333	.57735	.33333	26.8991	29.7676	28.00	29.00
DMSO 10%	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Total	42	13.6429	6.05995	.93507	11.7544	15.5313	.00	29.00

Test of Homogeneity of Variances

diameterhambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.804	13	28	.093

ANOVA

diameterhambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1482.310	13	114.024	136.829	.000
Within Groups	23.333	28	.833		
Total	1505.643	41			

Oneway

ANOVA

diameterhambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1482.310	13	114.024	136.829	.000
Within Groups	23.333	28	.833		
Total	1505.643	41			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: diameterhambat

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak 75%	ekstrak 50%	.66667	.74536	1.000	-2.0616	3.3950
	ekstrak 25%	1.33333	.74536	.863	-1.3950	4.0616
	fraksi n-heksan 75%	4.00000	.74536	.001	1.2717	6.7283
	fraksi n-heksan 50%	4.00000	.74536	.001	1.2717	6.7283
	fraksi n-heksan 25%	4.66667	.74536	.000	1.9384	7.3950
	fraksi etil asetat 75%	-3.33333	.74536	.007	-6.0616	-.6050
	fraksi etil asetat 50%	-2.66667	.74536	.060	-5.3950	.0616
	fraksi etil asetat 25%	-2.00000	.74536	.338	-4.7283	.7283
	fraksi air 75%	3.00000	.74536	.021	.2717	5.7283
	fraksi air 50%	3.33333	.74536	.007	.6050	6.0616
	fraksi air 25%	4.33333	.74536	.000	1.6050	7.0616
	kotrimoksazol	-13.33333	.74536	.000	-16.0616	-10.6050
	DMSO 10%	15.00000	.74536	.000	12.2717	17.7283
	ekstrak 75%	-.66667	.74536	1.000	-3.3950	2.0616
ekstrak 50%	ekstrak 25%	.66667	.74536	1.000	-2.0616	3.3950
	fraksi n-heksan 75%	3.33333	.74536	.007	.6050	6.0616
	fraksi n-heksan 50%	3.33333	.74536	.007	.6050	6.0616
	fraksi n-heksan 25%	4.00000	.74536	.001	1.2717	6.7283
	fraksi etil asetat 75%	-4.00000	.74536	.001	-6.7283	-1.2717
	fraksi etil asetat 50%	-3.33333	.74536	.007	-6.0616	-.6050
	fraksi etil asetat 25%	-2.66667	.74536	.060	-5.3950	.0616
	fraksi air 75%	2.33333	.74536	.153	-.3950	5.0616
	fraksi air 50%	2.66667	.74536	.060	-.0616	5.3950
	fraksi air 25%	3.66667	.74536	.002	.9384	6.3950
	kotrimoksazol	-14.00000	.74536	.000	-16.7283	-11.2717
	DMSO 10%	14.33333	.74536	.000	11.6050	17.0616
	ekstrak 75%	-1.33333	.74536	.863	-4.0616	1.3950
	ekstrak 50%	-.66667	.74536	1.000	-3.3950	2.0616
ekstrak 25%	fraksi n-heksan 75%	2.66667	.74536	.060	-.0616	5.3950
	fraksi n-heksan 50%	2.66667	.74536	.060	-.0616	5.3950
	fraksi n-heksan 25%	3.33333	.74536	.007	.6050	6.0616
	fraksi etil asetat 75%	-4.66667	.74536	.000	-7.3950	-1.9384

	fraksi etil asetat 50%	-4.00000*	.74536	.001	-6.7283	-1.2717
	fraksi etil asetat 25%	-3.33333*	.74536	.007	-6.0616	-.6050
	fraksi air 75%	1.66667	.74536	.609	-1.0616	4.3950
	fraksi air 50%	2.00000	.74536	.338	-.7283	4.7283
	fraksi air 25%	3.00000*	.74536	.021	.2717	5.7283
	kotrimoksazol	-14.66667*	.74536	.000	-17.3950	-11.9384
	DMSO 10%	13.66667*	.74536	.000	10.9384	16.3950
	ekstrak 75%	-4.00000*	.74536	.001	-6.7283	-1.2717
	ekstrak 50%	-3.33333*	.74536	.007	-6.0616	-.6050
	ekstrak 25%	-2.66667	.74536	.060	-5.3950	.0616
	fraksi n-heksan 50%	.00000	.74536	1.000	-2.7283	2.7283
	fraksi n-heksan 25%	.66667	.74536	1.000	-2.0616	3.3950
fraksi n-heksan 75%	fraksi etil asetat 75%	-7.33333*	.74536	.000	-10.0616	-4.6050
	fraksi etil asetat 50%	-6.66667*	.74536	.000	-9.3950	-3.9384
	fraksi etil asetat 25%	-6.00000*	.74536	.000	-8.7283	-3.2717
	fraksi air 75%	-1.00000	.74536	.982	-3.7283	1.7283
	fraksi air 50%	-.66667	.74536	1.000	-3.3950	2.0616
	fraksi air 25%	.33333	.74536	1.000	-2.3950	3.0616
	kotrimoksazol	-17.33333*	.74536	.000	-20.0616	-14.6050
	DMSO 10%	11.00000*	.74536	.000	8.2717	13.7283
	ekstrak 75%	-4.00000*	.74536	.001	-6.7283	-1.2717
	ekstrak 50%	-3.33333*	.74536	.007	-6.0616	-.6050
fraksi n-heksan 50%	ekstrak 25%	-2.66667	.74536	.060	-5.3950	.0616
	fraksi n-heksan 75%	.00000	.74536	1.000	-2.7283	2.7283
	fraksi n-heksan 25%	.66667	.74536	1.000	-2.0616	3.3950
	fraksi etil asetat 75%	-7.33333*	.74536	.000	-10.0616	-4.6050
	fraksi etil asetat 50%	-6.66667*	.74536	.000	-9.3950	-3.9384
	fraksi etil asetat 25%	-6.00000*	.74536	.000	-8.7283	-3.2717
	fraksi air 75%	-1.00000	.74536	.982	-3.7283	1.7283
	fraksi air 50%	-.66667	.74536	1.000	-3.3950	2.0616
	fraksi air 25%	.33333	.74536	1.000	-2.3950	3.0616
	kotrimoksazol	-17.33333*	.74536	.000	-20.0616	-14.6050
fraksi n-heksan 25%	DMSO 10%	11.00000*	.74536	.000	8.2717	13.7283
	ekstrak 75%	-4.66667*	.74536	.000	-7.3950	-1.9384
	ekstrak 50%	-4.00000*	.74536	.001	-6.7283	-1.2717
	ekstrak 25%	-3.33333*	.74536	.007	-6.0616	-.6050
	fraksi n-heksan 75%	-.66667	.74536	1.000	-3.3950	2.0616
	fraksi n-heksan 50%	-.66667	.74536	1.000	-3.3950	2.0616
	fraksi etil asetat 75%	-8.00000*	.74536	.000	-10.7283	-5.2717

	fraksi etil asetat 50%	-7.33333	.74536	.000	-10.0616	-4.6050
	fraksi etil asetat 25%	-6.66667*	.74536	.000	-9.3950	-3.9384
	fraksi air 75%	-1.66667	.74536	.609	-4.3950	1.0616
	fraksi air 50%	-1.33333	.74536	.863	-4.0616	1.3950
	fraksi air 25%	-.33333	.74536	1.000	-3.0616	2.3950
	kotrimoksazol	-18.00000*	.74536	.000	-20.7283	-15.2717
	DMSO 10%	10.33333*	.74536	.000	7.6050	13.0616
	ekstrak 75%	3.33333*	.74536	.007	.6050	6.0616
	ekstrak 50%	4.00000*	.74536	.001	1.2717	6.7283
	ekstrak 25%	4.66667*	.74536	.000	1.9384	7.3950
	fraksi n-heksan 75%	7.33333*	.74536	.000	4.6050	10.0616
	fraksi n-heksan 50%	7.33333*	.74536	.000	4.6050	10.0616
	fraksi n-heksan 25%	8.00000*	.74536	.000	5.2717	10.7283
fraksi etil asetat 75%	fraksi etil asetat 50%	.66667	.74536	1.000	-2.0616	3.3950
	fraksi etil asetat 25%	1.33333	.74536	.863	-1.3950	4.0616
	fraksi air 75%	6.33333*	.74536	.000	3.6050	9.0616
	fraksi air 50%	6.66667*	.74536	.000	3.9384	9.3950
	fraksi air 25%	7.66667*	.74536	.000	4.9384	10.3950
	kotrimoksazol	-10.00000*	.74536	.000	-12.7283	-7.2717
	DMSO 10%	18.33333*	.74536	.000	15.6050	21.0616
	ekstrak 75%	2.66667	.74536	.060	-.0616	5.3950
	ekstrak 50%	3.33333*	.74536	.007	.6050	6.0616
	ekstrak 25%	4.00000*	.74536	.001	1.2717	6.7283
	fraksi n-heksan 75%	6.66667*	.74536	.000	3.9384	9.3950
	fraksi n-heksan 50%	6.66667*	.74536	.000	3.9384	9.3950
	fraksi n-heksan 25%	7.33333*	.74536	.000	4.6050	10.0616
fraksi etil asetat 50%	fraksi etil asetat 75%	-.66667	.74536	1.000	-3.3950	2.0616
	fraksi etil asetat 25%	.66667	.74536	1.000	-2.0616	3.3950
	fraksi air 75%	5.66667*	.74536	.000	2.9384	8.3950
	fraksi air 50%	6.00000*	.74536	.000	3.2717	8.7283
	fraksi air 25%	7.00000*	.74536	.000	4.2717	9.7283
	kotrimoksazol	-10.66667*	.74536	.000	-13.3950	-7.9384
	DMSO 10%	17.66667*	.74536	.000	14.9384	20.3950
	ekstrak 75%	2.00000	.74536	.338	-.7283	4.7283
	ekstrak 50%	2.66667	.74536	.060	-.0616	5.3950
fraksi etil asetat 25%	ekstrak 25%	3.33333*	.74536	.007	.6050	6.0616
	fraksi n-heksan 75%	6.00000*	.74536	.000	3.2717	8.7283
	fraksi n-heksan 50%	6.00000*	.74536	.000	3.2717	8.7283
	fraksi n-heksan 25%	6.66667*	.74536	.000	3.9384	9.3950

	fraksi etil asetat 75%	-1.33333	.74536	.863	-4.0616	1.3950
	fraksi etil asetat 50%	-.66667	.74536	1.000	-3.3950	2.0616
	fraksi air 75%	5.00000*	.74536	.000	2.2717	7.7283
	fraksi air 50%	5.33333*	.74536	.000	2.6050	8.0616
	fraksi air 25%	6.33333*	.74536	.000	3.6050	9.0616
	kotrimoksazol	-11.33333*	.74536	.000	-14.0616	-8.6050
	DMSO 10%	17.00000*	.74536	.000	14.2717	19.7283
	ekstrak 75%	-3.00000*	.74536	.021	-5.7283	-.2717
	ekstrak 50%	-2.33333	.74536	.153	-5.0616	.3950
	ekstrak 25%	-1.66667	.74536	.609	-4.3950	1.0616
	fraksi n-heksan 75%	1.00000	.74536	.982	-1.7283	3.7283
	fraksi n-heksan 50%	1.00000	.74536	.982	-1.7283	3.7283
	fraksi n-heksan 25%	1.66667	.74536	.609	-1.0616	4.3950
fraksi air 75%	fraksi etil asetat 75%	-6.33333*	.74536	.000	-9.0616	-3.6050
	fraksi etil asetat 50%	-5.66667*	.74536	.000	-8.3950	-2.9384
	fraksi etil asetat 25%	-5.00000*	.74536	.000	-7.7283	-2.2717
	fraksi air 50%	.33333	.74536	1.000	-2.3950	3.0616
	fraksi air 25%	1.33333	.74536	.863	-1.3950	4.0616
	kotrimoksazol	-16.33333*	.74536	.000	-19.0616	-13.6050
	DMSO 10%	12.00000*	.74536	.000	9.2717	14.7283
	ekstrak 75%	-3.33333*	.74536	.007	-6.0616	-.6050
	ekstrak 50%	-2.66667	.74536	.060	-5.3950	.0616
	ekstrak 25%	-2.00000	.74536	.338	-4.7283	.7283
	fraksi n-heksan 75%	.66667	.74536	1.000	-2.0616	3.3950
	fraksi n-heksan 50%	.66667	.74536	1.000	-2.0616	3.3950
	fraksi n-heksan 25%	1.33333	.74536	.863	-1.3950	4.0616
fraksi air 50%	fraksi etil asetat 75%	-6.66667*	.74536	.000	-9.3950	-3.9384
	fraksi etil asetat 50%	-6.00000*	.74536	.000	-8.7283	-3.2717
	fraksi etil asetat 25%	-5.33333*	.74536	.000	-8.0616	-2.6050
	fraksi air 75%	-.33333	.74536	1.000	-3.0616	2.3950
	fraksi air 25%	1.00000	.74536	.982	-1.7283	3.7283
	kotrimoksazol	-16.66667*	.74536	.000	-19.3950	-13.9384
	DMSO 10%	11.66667*	.74536	.000	8.9384	14.3950
	ekstrak 75%	-4.33333*	.74536	.000	-7.0616	-1.6050
	ekstrak 50%	-3.66667*	.74536	.002	-6.3950	-.9384
	ekstrak 25%	-3.00000*	.74536	.021	-5.7283	-.2717
fraksi air 25%	fraksi n-heksan 75%	-.33333	.74536	1.000	-3.0616	2.3950
	fraksi n-heksan 50%	-.33333	.74536	1.000	-3.0616	2.3950
	fraksi n-heksan 25%	.33333	.74536	1.000	-2.3950	3.0616

	fraksi etil asetat 75%	-7.66667*	.74536	.000	-10.3950	-4.9384
	fraksi etil asetat 50%	-7.00000*	.74536	.000	-9.7283	-4.2717
	fraksi etil asetat 25%	-6.33333*	.74536	.000	-9.0616	-3.6050
	fraksi air 75%	-1.33333	.74536	.863	-4.0616	1.3950
	fraksi air 50%	-1.00000	.74536	.982	-3.7283	1.7283
	kotrimoksazol	-17.66667*	.74536	.000	-20.3950	-14.9384
	DMSO 10%	10.66667*	.74536	.000	7.9384	13.3950
	ekstrak 75%	13.33333*	.74536	.000	10.6050	16.0616
	ekstrak 50%	14.00000*	.74536	.000	11.2717	16.7283
	ekstrak 25%	14.66667*	.74536	.000	11.9384	17.3950
	fraksi n-heksan 75%	17.33333*	.74536	.000	14.6050	20.0616
	fraksi n-heksan 50%	17.33333*	.74536	.000	14.6050	20.0616
	fraksi n-heksan 25%	18.00000*	.74536	.000	15.2717	20.7283
kotrimok sazol	fraksi etil asetat 75%	10.00000*	.74536	.000	7.2717	12.7283
	fraksi etil asetat 50%	10.66667*	.74536	.000	7.9384	13.3950
	fraksi etil asetat 25%	11.33333*	.74536	.000	8.6050	14.0616
	fraksi air 75%	16.33333*	.74536	.000	13.6050	19.0616
	fraksi air 50%	16.66667*	.74536	.000	13.9384	19.3950
	fraksi air 25%	17.66667*	.74536	.000	14.9384	20.3950
	DMSO 10%	28.33333*	.74536	.000	25.6050	31.0616
	ekstrak 75%	-15.00000*	.74536	.000	-17.7283	-12.2717
	ekstrak 50%	-14.33333	.74536	.000	-17.0616	-11.6050
	ekstrak 25%	-13.66667*	.74536	.000	-16.3950	-10.9384
	fraksi n-heksan 75%	-11.00000*	.74536	.000	-13.7283	-8.2717
	fraksi n-heksan 50%	-11.00000*	.74536	.000	-13.7283	-8.2717
	fraksi n-heksan 25%	-10.33333*	.74536	.000	-13.0616	-7.6050
DMSO 10%	fraksi etil asetat 75%	-18.33333*	.74536	.000	-21.0616	-15.6050
	fraksi etil asetat 50%	-17.66667*	.74536	.000	-20.3950	-14.9384
	fraksi etil asetat 25%	-17.00000*	.74536	.000	-19.7283	-14.2717
	fraksi air 75%	-12.00000*	.74536	.000	-14.7283	-9.2717
	fraksi air 50%	-11.66667*	.74536	.000	-14.3950	-8.9384
	fraksi air 25%	-10.66667*	.74536	.000	-13.3950	-7.9384
	kotrimoksazol	-28.33333*	.74536	.000	-31.0616	-25.6050

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

Homogeneous Subsets

diameterhambat

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
DMSO 10%	3	.0000								
fraksi n-heksan 25%	3		10.3333							
fraksi air 25%	3		10.6667							
fraksi n-heksan 75%	3		11.0000	11.0000						
fraksi n-heksan 50%	3		11.0000	11.0000						
fraksi air 50%	3		11.6667	11.6667	11.6667					
fraksi air 75%	3		12.0000	12.0000	12.0000					
ekstrak 25%	3			13.6667	13.6667	13.6667				
ekstrak 50%	3				14.3333	14.3333	14.3333			
ekstrak 75%	3					15.0000	15.0000	15.0000		
fraksi etil asetat 25%	3						17.0000	17.0000	17.0000	
fraksi etil asetat 50%	3							17.6667	17.6667	
fraksi etil asetat 75%	3								18.3333	
kotrimoksazol	3									28.3333
Sig.		1.000	.609	.060	.060	.863	.060	.060	.863	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.