

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT
DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG
(*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) TERHADAP
Escherichia coli ATCC 25922**



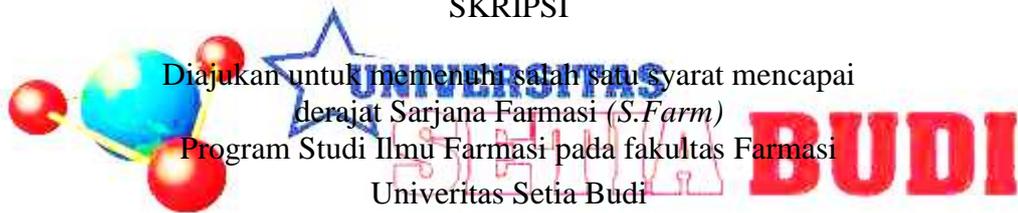
Oleh:

**Nisa Fitri Andhini
19133910A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT
DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG
(*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) TERHADAP
Escherichia coli ATCC 25922**

SKRIPSI



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

Oleh:

**Nisa Fitri Andhini
19133910A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT
DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG
(*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) TERHADAP
Escherichia coli ATCC 25922**

Oleh:
Nisa Fitri Andhini
19133910A

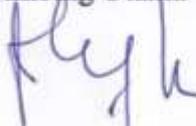
Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal 8 Juni 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



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

Pembimbing Utama



Reslely Harjanti, S.Farm., M.Sc., Apt

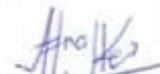
Pembimbing Pendamping

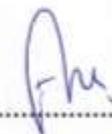


D. Andang Arif W., SP., M.Si

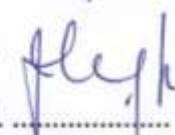
Penguji :

1. Dr. Ana Indrayati, M.Si
2. Ghani Nurfiana FS, M.Farm., Apt
3. Anita Nilawati, M.Farm., Apt
4. Reslely Harjanti, S.Farm., M.Sc., Apt

1. 

2. 

3. 

4. 

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu Perguruan Tinggi dan sepanjang sepengetahuan 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, atau skripsi orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi baik secara akademis maupun hukum. Demikian pernyataan ini saya buat dengan semestinya.

Surakarta, 08 Juni 2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Nisa Fitri Andhini', enclosed in a light blue rectangular box.

Nisa Fitri Andhini

PERSEMBAHAN

“Jadilah seperti angin. Tidak perlu terlihat, namun mampu merubuhkan.

Tidak harus selalu memunculkan diri walau sebenarnya selalu ada.

Karena untuk memberikan manfaat tidak harus jadi yang paling terlihat”.

Skripsi ini saya persembahkan kepada :

1. Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya hingga saya mampu menyelesaikan skripsi ini.
2. Bapak (Nuzul Hidayat) dan Ibu (Ismi Maria), Orang tua tercinta yang telah banyak berkorban untuk saya, terimakasih untuk semua doa, nasehat, semangat dan dukungannya selama ini.
3. Muhammad Oktavianzha Atmadja, adik kesayangan satu-satunya yang suatu saat akan lebih sukses dari kakaknya.
4. Seluruh keluarga besar, yang menjadi sumber inspirasiku, pendorongku menjadi lebih dewasa dan menjadikan ku lebih bersyukur.
5. Sahabat sekaligus saudara kesayangan Silviana Indriyani, terimakasih sudah selalu ada baik susah maupun senang, teman curhat, teman ketawa, teman sedih, teman makan, teman jalan, dan semuanya.
6. Teman seperjuangan “*Team Skripsi Upak-upuk*” Ipik, Yuli, dan Bernad yang selama ini selalu membantu dan menyemangati saya dalam melaksanakan penelitian ini.
7. Fajar Kharisma, yang telah menjadi pendengar yang baik, selalu memberikan semangat dan dukungan dari jauh lewat doa.
Sahabat terkasih Annisa Maudyna dan Sahabat Ubi (JS, Dhani, Oja, Ferlita, Hayyu, Iyah, Rika, Sesa, Sera, Yuni, Kartika, Nonov, Rina) yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan dari jauh.
8. Sahabat perantauan terkasih Kitty Elite (Ope, Dina, Jeni, Atul, Marwin, Bobi, Ari) yang saling memberi doa, semangat dan dukungan.

9. Sahabat-sahabat tersayang My Btches (Eka, Jovita, Rani, Endah, Ressa, Vekta, Galuh, Lala, Ina, Lina) yang saling memberikan doa, semangat dan dukungan.
10. Grup Luar Biasa (Yuli, Ipik, Nita, Imam, Abi, Dono, Wisnu, Irsyad), yang saling memberi doa, semangat dan dukungan, kalian semua luar biasa.
11. Seluruh teman-teman S1 farmasi angkatan 2013 terutama “Teori 4 dan FKK 4” teman seperjuangan yang saling membantu dan memberi dukungan.
12. Agama, Almamater, Bangsa, dan Negara yang saya banggakan.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul “**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922**”. Skripsi ini disusun sebagai sebuah proses pembelajaran dan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan jenjang pendidikan Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini terdapat hal-hal yang kurang sempurna, sehubungan dengan keterbatasan penulis. Walaupun demikian, penulis telah berusaha semaksimal mungkin agar isi dalam skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada :

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA, selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Ganet Eko Pramukantoro, M.Si., Apt, selaku pembimbing akademik yang senantiasa membimbing dan memberi nasihat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
4. Reslely Harjanti, S.Farm., M.Sc., Apt, selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu dalam membimbing, menasehati, mengarahkan dan memberi semangat pada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. D. Andang Arif Wibawa, SP., M.Si, selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu dalam membimbing dan keikhlasannya dalam

memberikan ilmu serta semangat kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

6. Dr. Ana Indrayati, M.Si, selaku penguji pertama yang telah bersedia meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan saran serta masukan yang membangun untuk memperbaiki skripsi ini.
7. Ghani Nurfiana FS, M.Farm., Apt, selaku penguji dua yang telah bersedia meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan saran serta masukan yang membangun untuk memperbaiki skripsi ini.
8. Anita Nilawati, M.Farm., Apt, selaku penguji tiga yang telah bersedia meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan saran serta masukan yang membangun untuk memperbaiki skripsi ini.
9. Penguji proposal dan seminar hasil yang telah bersedia meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan saran serta masukan yang membangun untuk memperbaiki skripsi ini.
10. Segenap dosen dan staff laboratorium Universitas Setia Budi yang telah membantu dan membimbing penulis selama melaksanakan penelitian.
11. Teman-teman yang tidak bisa disebutkan satu persatu, selalu mendukung dan membantu hingga skripsi ini selesai.

Semoga Allah SWT memberikan limpahan rahmat-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan dan masih terdapat banyak kekurangan serta kesalahan yang tidak disadari penulis. Penulis mengharapkan saran dan kritik dari pembaca, demi kebaikan penulisan selanjutnyaa dimasa yang akan datang. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kefarmasian.

Surakarta, Juni 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERNYATAAN.....	iii
PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
INTISARI.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Kegunaan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Tanaman Binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	5
1. Sistematika tanaman	5
2. Nama umum/dagang	5
3. Morfologi tanaman binahong	6
4. Khasiat tanaman binahong	6
5. Kandungan kimia	7
5.1 Saponin	7
5.2 Flavonoid	7
5.3 Alkaloid	7
5.4 Terpenoid.....	8
B. Simplisia	8
1. Pengertian simplisia	8
2. Pengumpulan simplisia	9
3. Pencucian dan pengeringan simplisia	9
C. Ekstraksi.....	9

1.	Pengertian ekstraksi	9
2.	Metode ekstraksi	10
3.	Fraksinasi	10
4.	Pelarut	11
D.	Media	12
1.	Pengertian	12
2.	Macam-macam media	12
3.	Klasifikasi media	13
3.1.	Media sintetik	13
3.2.	Media kompleks	13
3.3.	Media anaerob	13
3.4.	Media biakan khusus	13
3.5.	Media selektif dan diferensial	13
E.	Sterilisasi	14
F.	<i>Escherichia coli</i>	15
1.	Sistematika <i>Escherichia coli</i>	15
2.	Morfologi dan identifikasi	15
3.	Toksin <i>Escherichia coli</i>	16
4.	Patogenesis	16
5.	Pengobatan diare	17
6.	Mekanisme antibakteri	17
6.1	Penghambatan metabolisme sel bakteri	17
6.2	Penghambatan sintesis dinding sel	18
6.3	Perubahan permeabilitas membran sel bakteri	18
6.4	Penghambatan sintesis protein sel bakteri	18
6.5	Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri	18
G.	Antibakteri	19
1.	Antibakteri	19
2.	Metode pengujian aktivitas antibakteri	19
2.1.	Metode difusi	19
2.2.	Metode dilusi	19
H.	Kotrimoksazol	19
I.	Landasan Teori	20
J.	Hipotesis	22
BAB III METODE PENELITIAN		24
A.	Populasi dan Sampel	24
1.	Populasi	24
2.	Sampel	24
B.	Variabel Penelitian	24
1.	Identifikasi variabel utama	24
2.	Klasifikasi variabel utama	24
3.	Definisi operasional variabel utama	25
C.	Alat dan Bahan	26
1.	Alat	26
2.	Bahan	26

D. Jalannya Penelitian	27
1. Determinasi tanaman	27
2. Pengeringan bahan.....	27
3. Pembuatan serbuk.....	27
4. Penetapan kadar lembab daun binahong.....	27
5. Pembuatan ekstrak etanol daun binahong metode maserasi.....	28
6. Uji bebas etanol ekstrak daun binahong	28
7. Fraksinasi dari ekstrak etanol daun binahong.....	28
8. Penetapan persen rendemen.....	28
9. Identifikasi kandungan kimia pada ekstrak dan fraksi daun binahong	28
9.1 Identifikasi flavonoid.....	29
9.2 Identifikasi alkaloid	29
9.3 Identifikasi saponin.	29
9.4 Identifikasi terpenoid.....	29
10. Sterilisasi.....	29
11. Identifikasi makroskopis <i>Escherichia coli</i> pada medium diferensial	29
12. Identifikasi mikroskopis <i>Escherichia coli</i> dengan pewarnaan Gram.....	30
13. Identifikasi <i>Escherichia coli</i> dengan uji biokimia.....	30
13.1 Media SIM (<i>Sulfide Indol Motilitas</i>).....	30
13.2 Media KIA (<i>Kliger Iron Agar</i>).....	30
13.3 Media LIA (<i>Lisin Iron Agar</i>).....	31
13.4 Media Sitrat	31
14. Pembuatan suspensi bakteri uji.....	31
15. Pengujian aktivitas antibakteri.....	31
E. Analisis Data.....	33
 BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	 37
1. Identifikasi tanaman binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	37
2. Pembuatan serbuk daun binahong	37
2.1 Pengumpulan bahan.....	37
2.2 Pengeringan daun binahong.	37
3. Penetapan kadar lembab serbuk daun binahong	38
4. Pembuatan ekstrak etanol daun binahong.....	38
5. Uji bebas etanol ekstrak maserasi daun binahong	39
6. Uji fraksinasi ekstrak etanol daun binahong.....	39
7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi teraktif daun binahong	41
8. Identifikasi bakteri uji.....	42
8.1 Identifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i> secara makroskopis.....	42
8.2 Identifikasi mikroskopis bakteri <i>Escherichia coli</i> dengan pewarnaan Gram.	42

8.3 Identifikasi biokimia bakteri <i>Escherichia coli</i>	42
9. Pembuatan suspensi bakteri	44
10. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksinasi daun binahong terhadap <i>Escherichia coli</i> secara difusi.....	45
11. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi	49
BAB V KESIMPULAN DAN PENUTUP	52
A. Kesimpulan	52
B. Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	57

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tanaman binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	5
Gambar 2. <i>Escherichia coli</i>	15
Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	34
Gambar 4. Skema uji <i>Escherichia coli</i> dengan metode difusi	35
Gambar 5. Skema uji <i>Escherichia coli</i> dengan metode dilusi	36

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong	37
Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab daun binahong menggunakan alat <i>moisture balance</i>	38
Tabel 3. Rendemen ekstrak etanol daun binahong.....	39
Tabel 4. Uji bebas etanol ekstrak maserasi daun binahong.....	39
Tabel 5. Rendemen hasil fraksinasi.....	40
Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi daun binahong	41
Tabel 7. Hasil identifikasi biokimia pada <i>Escherichia coli</i>	43
Tabel 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksinasi daun binahong terhadap <i>Escherichia coli</i> secara difusi.....	45
Tabel 9. Hasil uji dilusi fraksi air dan kotrimoksazol	50

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman binahong.....	58
Lampiran 2. Tanaman dan serbuk daun binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	59
Lampiran 3. Gambar daun binahong basah, oven, simplisia daun binahong, mesin penggiling, ayakan 40, botol gelap, penyaringan ekstrak dan <i>Rotary Evaporator</i>	60
Lampiran 4. Penetapan kadar lembab serbuk daun binahong dan uji bebas alkohol ekstrak binahong.....	62
Lampiran 5. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi daun binahong	63
Lampiran 6. Fraksinasi <i>n</i> -heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air	66
Lampiran 7. Ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air	67
Lampiran 8. Hasil identifikasi <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	68
Lampiran 9. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong	69
Lampiran 10. Rendemen ekstrak etanol daun binahong	70
Lampiran 11. Hasil perhitungan rendemen fraksinasi	71
Lampiran 12. Perhitungan pembuatan konsentrasi ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan air metode difusi	73
Lampiran 13. Pembuatan larutan stok dilusi.....	74
Lampiran 14. Penghitungan konsentrasi pembanding kotrimoksazol secara difusi dan dilusi	76
Lampiran 15. Hasil uji aktivitas antibakteri metode difusi.....	79
Lampiran 16. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air metode dilusi.....	82
Lampiran 17. Hasil uji aktivitas antibakteri kotrimoksazol metode dilusi	84
Lampiran 18. Alat yang digunakan untuk praktikum	87
Lampiran 19. Formulasi dan pembuatan media.....	89

Lampiran 20. Hasil analisis data uji ANOVA antara fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, ekstrak etanol dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, kontrol (+), dan kontrol (-).....92

INTISARI

ANDHINI, N.F., 2017, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) TERHADAP *Escherichia coli* ATCC 25922. SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) merupakan jenis tanaman yang berkhasiat untuk menyembuhkan beberapa macam penyakit. Daun binahong mengandung flavonoid, alkaloid, saponin dan terpenoid yang memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun binahong terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Serbuk daun binahong diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, kemudian difraksinasi menggunakan pelarut fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yang berbeda polaritasnya. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi dan dilusi. Konsentrasi yang digunakan dalam metode difusi 50%, 25% dan 12,5% bertujuan untuk mengetahui fraksi teraktif. Fraksi teraktif kemudian dilakukan uji dilusi untuk mengetahui KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) menggunakan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,09%. Analisis statistik menggunakan ANOVA *oneway* guna mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antar sediaan uji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua fraksi dan ekstrak *Anredera cordifolia* (Ten.) Steen mempunyai aktivitas antibakteri. Fraksi air merupakan fraksi teraktif dengan diameter hambat pada konsentrasi 50% (19,1 mm), konsentrasi 25% (15,83 mm) dan konsentrasi 12,5% (13,26 mm). Hasil uji dilusi fraksi air menunjukkan aktivitas antibakteri dengan KBM 6,25%. Hasil identifikasi fitokimia menunjukkan fraksi air mengandung flavonoid, alkaloid dan saponin.

Kata kunci : Daun binahong, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

ANDHINI, N.F., 2017, ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF FRACTION *n*-HEXANE, ETHYL ACETATE AND WATER OF ETHANOL EXTRACT FROM BINAHONG (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) LEAVES TO *Escherichia coli* ATCC 25922. THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Binahong leaf (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) are species of crops which good to heal some kinds of diseases. Binahong leaves contains flavonoid, alkaloid, saponin and terpenoid that have antibacterial activity. This study aims to determine the antibacterial activity of the fraction of *n*-hexane, ethyl acetate and water from binahong leaves ethanol extract against *Escherichia coli* ATCC 25922.

Binahong leaves powder was extracted by maceration method by ethanol 70%, and then it was fractionated by solvent *n*-hexane, ethyl acetate and water which have different polarity. Antibacterial activity test was performed using diffusion and dilution methods. The concentration used in the diffusion method was 50%, 25% and 12,5% aimed to determine the most active fraction. The most active fraction is continued dilution test to determine the MBC (Minimum Bactericidal Concentration) with concentration 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.19%, 0.09%. Statistical analysis using oneway ANOVA to determine whether there is a significant difference between the test preparation.

The results shows that all the fractions and extracts of *Anredera cordifolia* (Ten.) Steen had antibacterial activity. Water fraction is most active fraction with concentration of 50% (19.1 mm), concentration of 25% (15.83 mm) and concentration of 12.5% (13.26 mm). Dilution test results water fraction showed antibacterial activity with MBC 6.25%. The results of phytochemical identification showed fractions of water containing flavonoid, alkaloid and saponin.

Keywords : Binahong leaves, fraction of *n*-hexane, ethyl acetate fraction, fraction of water, *Escherichia coli*.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi masih merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk di negara berkembang, termasuk Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri (Radji 2011). *Escherichia coli* adalah bakteri Gram negatif dan merupakan flora normal yang banyak ditemukan di saluran usus manusia. Bakteri *Escherichia coli* di dalam usus, bersifat non patogen dan dapat membantu fungsi normal dan nutrisi. Organisme ini menjadi patogen bila mencapai jaringan di luar saluran pencernaan khususnya saluran air kemih menyebabkan ISK (Infeksi Saluran Kemih), di aliran darah dapat menyebabkan sepsis, dan di paru-paru atau di peritoneum menyebabkan peradangan. *Escherichia coli* juga dapat menyebabkan infeksi primer pada usus, misalnya diare pada anak (Gillespie & Bamford 2008). *Escherichia coli* dapat menyebar melalui debu yang terkontaminasi atau melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi dengan feses (Ginns 2000).

Indonesia dikenal memiliki lebih dari 20.000 spesies tanaman obat, sementara 1.000 spesies tanaman obat saja yang sudah didata dan baru sekitar 300 spesies yang sudah dimanfaatkan untuk pengobatan (Hariana 2004). Penelitian yang telah dilakukan terhadap tanaman obat sangat membantu dalam pemilihan bahan baku obat tradisional. Pengalaman empiris ditunjang dengan penelitian semakin memberikan keyakinan akan khasiat dan keamanan obat tradisional (Lusia 2006).

Obat tradisional dipercaya memiliki efek samping yang lebih ringan dibandingkan obat sintetik (Hambali *et al.* 2005). Salah satu tanaman obat tradisional yang digunakan secara empiris oleh masyarakat adalah tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).

Berdasarkan hasil penelitian Aini (2012), ekstrak yang berpotensi sebagai antibakteri berturut-turut adalah ekstrak etanol 70%, *n*-heksana dan etil asetat. Hasil skrining fitokimia menunjukkan ekstrak etanol *n*-heksana dan ekstrak etil

asetat daun binahong mengandung terpenoid, sedangkan ekstrak etanol 70% daun binahong mengandung saponin, flavonoid dan alkaloid. Menurut Fitriyah *et al.* (2013) menemukan bahwa daun binahong mengandung senyawa alkaloid, polifenol, dan saponin yang bersifat sebagai antibakteri sehingga dapat dimanfaatkan sebagai obat herbal alami. Setiaji (2009) juga melaporkan bahwa ekstrak petroleum eter, etil asetat, dan etanol 70% rhizoma binahong dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hasil uji skrining fitokimia mengandung alkaloid, flavonoid, dan saponin.

Kemampuan binahong untuk menyembuhkan berbagai jenis penyakit ini berkaitan erat dengan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. Flavonoid dapat berperan langsung sebagai antibakteri dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme bakteri (Manoi & Balittro 2009). Senyawa alkaloid, saponin, dan terpenoid juga merupakan senyawa yang berkhasiat sebagai antibakteri (Robinson 1995).

Berdasarkan latar belakang tersebut bahwa daun binahong mempunyai aktivitas sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Hal ini mendasari perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut ke tahap fraksinasi. Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan komponen senyawa kimia berdasarkan perbedaan polaritasnya. Metode penyarian yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut etanol 70%. Etanol 70% digunakan sebagai cairan penyari karena lebih selektif, kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air.

Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dilakukan dengan menggunakan cakram, sumuran atau silinder tak beralas. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat. Metode difusi dipengaruhi oleh faktor kimia, faktor antar obat dan organisme (Jawetz *et al.* 2012). Metode dilusi digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan metode dilusi dapat ditentukan secara kuantitatif konsentrasi terkecil

suatu obat yang dapat menghambat dan membunuh bakteri. Nilai KHM dapat ditentukan dengan melihat kekeruhan pada tabung reaksi sedangkan nilai KBM dapat ditentukan berdasarkan hasil pengamatan pada goresan media.

Berdasarkan latar belakang di atas maka dilakukan penelitian tentang uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut:

Pertama, apakah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922?

Kedua, berapa Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922?

Ketiga, diantara fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) manakah fraksi yang paling aktif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

Pertama, untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, untuk mengetahui fraksi yang paling aktif terhadap aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi masyarakat sebagai obat tradisional dan dapat menambah ilmu pengetahuan bagi masyarakat untuk mengatasi masalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

1. Sistematika tanaman

Klasifikasi tanaman binahong berdasarkan tata nama tumbuhan dan penggolongan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Sub Class	: Hamamelidae
Ordo	: Caryophyllales
Familia	: Basellaceae
Genus	: <i>Anredera</i>
Spesies	: <i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis (Mus 2009).



Gambar 1. Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

2. Nama umum/dagang

Tanaman binahong memiliki nama ilmiah : *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis, selain itu tanaman binahong memiliki nama daerah : *gondola* (Sunda), *gendola* (Bali), *lembayung* (Minangkabau), *genjerot*, *gedrek*, *uci-uci* (Jawa), *kandula* (Madura), *tatabuwe* (Sulawesi Utara), *poiloo* (Gorontalo), *kandola*

(Timor), dan memiliki nama asing: *heartleaf maderavine madevine* (inggris) dan *dheng shan chi* (Cina) (Hariana 2002).

3. Morfologi tanaman binahong

Tanaman binahong merupakan tumbuhan menjalar, berumur panjang (perennial), panjang tanaman ini bisa mencapai ± 5 m. Akar dari tanaman binahong berbentuk rimpang, berdaging lunak. Batang lunak, silindris, saling membelit, berwarna merah, bagian dalam solid, permukaan halus, kadang membentuk semacam umbi yang melekat di ketiak daun dengan bentuk tak berwarna dan bertekstur kasar. Berdaun tunggal, bertangkai sangat pendek (sessile), tersusun berseling, berwarna hijau, berbentuk jantung (cordata), panjang 5 - 10 cm, lebar 3 - 7 cm, helaian daun tipis lemas, ujung runcing, pangkal berlekuk (emarginatus), tepi rata, permukaan licin. Tanaman binahong memiliki bunga majemuk yang berbentuk tandan, bertangkai panjang, muncul di ketiak daun, mahkota berwarna krem keputih-putihan berjumlah lima helai tidak berlekatan, panjang helai mahkota 0,5 - 1 cm, berbau harum. Perbanyak generatif (biji), namun lebih sering berkembang atau dikembangbiakan secara vegetatif melalui akar rimpangnya (Mus 2009).

4. Khasiat tanaman binahong

Tanaman binahong mempunyai manfaat yang sangat besar dalam dunia pengobatan, secara empiris binahong dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Bagian tanaman daun binahong yang digunakan dalam pengobatan dapat berasal dari akar, batang, daun, dan bunga maupun umbi yang menempel pada ketiak daun. Tanaman ini dikenal dengan sebutan *Madeira Vine* dipercaya memiliki kandungan antioksidan tinggi dan antivirus. Tanaman ini masih diteliti meski dalam lingkup terbatas. Percobaan pada tikus yang disuntik dengan bahan ekstrak dari binahong dapat meningkatkan daya tahan tubuh, peningkatan agresivitas tikus dan tidak mudah sakit. Beberapa penyakit yang dapat disembuhkan dengan menggunakan tanaman ini adalah kerusakan ginjal, diabetes, pembengkakan jantung, muntah darah, tifus, stroke, wasir, reumatik, pemulihan pasca operasi, pemulihan pasca melahirkan, menyembuhkan segala luka dalam dan khitanan, radang usus, melancarkan dan menormalkan peredaran darah dan

tekanan darah, sembelit, sesak napas, sariawan berat, pusing-pusing, sakit perut, menurunkan panas tinggi, menyuburkan kandungan, maag, asam urat, keputihan, pembengkakan hati, meningkatkan vitalitas dan daya tahan tubuh (Manoi 2009).

Menurut Tshikalange et al. (2005) ekstrak air akar binahong dengan dosis 50 mg/mL memiliki daya hambat terhadap bakteri Gram positif (*Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*) serta pada bakteri Gram negatif (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*, dan *Enterobacter aerogenes*) pada dosis 60 mg/mL, tetapi tidak pada bakteri *Bacillus cereus*.

5. Kandungan kimia

Berdasarkan jurnal hasil penelitian sebelumnya, ekstrak yang berpotensi sebagai antibakteri berturut-turut adalah ekstrak etanol 70%, *n*-heksana dan etil asetat. Hasil skrining fitokimia menunjukkan ekstrak *n*-heksana dan etil asetat daun binahong mengandung terpenoid sedangkan ekstrak etanol 70% daun binahong mengandung saponin, flavonoid dan alkaloid (Aini 2012).

5.1 Saponin. Saponin adalah golongan senyawa glikosida yang umumnya larut dalam pelarut polar, misalnya etanol. Saponin juga merupakan senyawa aktif, menimbulkan busa jika di kocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Penyarian senyawa saponin akan memberikan hasil yang lebih baik sebagai antibakteri bila menggunakan pelarut etanol 70%. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah melibatkan pembentukan kompleks dengan sterol pada membran plasma sehingga menghancurkan semi permeabilitas sel, kemudian mengarah pada kematian sel (Kumalasari dan Sulistyani 2011).

5.2 Flavonoid. Senyawa flavonoid diturunkan dari unit C₆-C₃ (fenil propana) yang bersumber dari asam sikimat (via fenilananin) unit C₆ yang diturunkan dari jalur poliketida. Flavonoid pada tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid (Harborne 2007).

5.3 Alkaloid. Alkaloid adalah senyawa yang mengandung nitrogen yang bersifat basa. Sifat basa tersebut tergantung dari adanya pasangan elektron pada nitrogen. Sebagian besar alkaloida mempunyai kerangka dasar polisiklik termasuk

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

5.4 Terpenoid. Terpenoid adalah semua senyawa yang terbentuk dari satuan isoterpen. Senyawa terpenoid merupakan senyawa hidrokarbon yang dibedakan berdasarkan jumlah satuan isoprena penyusunnya, group metil, dan atom oksigen yang diikatnya (Robinson 1995). Terpenoid tumbuhan mempunyai manfaat penting sebagai obat tradisional, antibakteri, antijamur, dan gangguan kesehatan (Thomson 2008). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan dengan mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel dan menyebabkan membran atau dinding sel tidak terbentuk sempurna (Ajizah 2004).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bentuk jamak dari kata *simpleks* yang berarti berasal dari kata *simple*, berarti satu atau sederhana. Simplisia adalah bahan alami yang digunakan sebagai bahan obat dan belum mengalami perubahan proses apapun, kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan.

Simplisia terdiri atas tiga golongan yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan/mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang dapat berupa tanaman utuh, bagian tanaman, eksudat tanaman, atau gabungan dari ketiganya. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa bahan kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan tidak berupa bahan kimia murni (Gunawan dan Mulyani 2004).

2. Pengumpulan simplisia

Bagian simplisia yang diambil dari tanaman, misalnya daun, bunga, buah, akar atau rimpang. Hal ini karena zat berkhasiat tidak terdapat pada seluruh bagian dari tanaman. Kadangkala ada bagian dari tanaman justru beracun dan tidak dikehendaki. Bila yang dikumpulkan daun sebaiknya tidak tercampur dengan bagian lain dari tanaman seperti biji, bunga, atau tangkai. Pengumpulan simplisia juga perlu memperhatikan kondisi khusus, misalnya pemanenan daun yang dilakukan sewaktu daun masih muda atau ketika masih tunas (Dalimartha 2008).

3. Pencucian dan pengeringan simplisia

Pencucian simplisia bertujuan untuk melepaskan kotoran (tanah, debu, dan kotoran lainnya) yang melekat pada tanaman obat sehingga mikroba atau kotoran yang dapat merusak dan mengubah komposisi zat pada tanaman dapat dihilangkan. Proses pencucian dilakukan dengan cara mengalirkan air bersih pada simplisia sehingga kotoran dapat terlarut dan terbuang. Kualitas air yang digunakan untuk membersihkan simplisia harus air bersih yang tidak mengandung mikroba atau logam, air yang digunakan disarankan dengan air tanah yang bersih (Dalimartha 2008).

Pengeringan simplisia bertujuan mengurangi kadar air simplisia, sehingga simplisia tidak mudah rusak, berjamur, atau kandungan bahan aktif berubah jika disimpan dalam waktu cukup lama. Sebelum proses pengeringan, simplisia seperti rimpang, batang, atau kulit kayu dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan. Pengeringan dilakukan secara alami, dilakukan dengan menjemur di bawah sinar matahari langsung. Simplisia ini dihamparkan merata setipis mungkin dengan alas tikar atau plastik dengan sambil sering dibalik agar keringnya merata (Dalimartha 2008).

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi merupakan sediaan kering, kental atau cair, dibuat dengan mengambil sari simplisia nabati atau hewani dengan cara yang sesuai, di luar

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

2. Metode ekstraksi

Metode maserasi (*macerace* : mengairi, melunakkan) merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara serbuk simplisia direndam dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut, akan adanya perbedaan konsentrasi. Cairan penyari yang digunakan bisa berupa air, air-etanol, atau pelarut lain.

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan satu bagian serbuk kering simplisia ke dalam maserator, tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi, ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya 2 kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes 2011).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu golongan utama yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Pemisahan jumlah dan jenisnya menjadi fraksi yang berbeda, mula-mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda

polaritasnya. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari dengan pelarut kurang polar, dan yang terakhir disari dengan pelarut polar (Harborne 2007).

4. Pelarut

Pemilihan pelarut yang sesuai merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang dapat menyari sebagian besar metabolit sekunder yang diinginkan dalam simplisia (Depkes 2008). Etanol digunakan sebagai cairan penyari karena lebih selektif, kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Etanol lebih mudah menembus membran sel dalam mengekstrak bahan intraseluler dan bahan tanaman. Hampir semua mengidentifikasi komponen aktif dari tanaman terhadap mikroorganisme yang aromatik atau jenuh. Senyawa organik diperoleh melalui etanol awal atau ekstraksi metanol, metanol lebih polar dibanding etanol karena sifat metanol lebih sitotoksik, hal ini tidak cocok untuk ekstraksi dalam beberapa jenis penelitian karena mengakibatkan salah hasil (Tiwari et al. 2011).

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

Etil asetat merupakan merupakan cairan jernih tidak berwarna pada suhu kamar dengan bau khas seperti buah. Etil asetat larut dalam 15 bagian air, dapat tercampur dengan eter, etanol, dan kloroform. Etil asetat ialah pelarut semi polar, mudah terbakar dan menguap, maka penyimpanannya dalam wadah yang tertutup rapat serta terhindar dari panas. Senyawa yang larut dalam pelarut ini adalah flavonoid, alkaloid, senyawa-senyawa fenolik seperti fenol-fenol, asam fenolat, fenil propanoid, antrakuinon dan xanton (Harborne 2006).

Air adalah pelarut yang sangat polar digunakan untuk menyari senyawa-senyawa organik polar sehingga cocok digunakan untuk pelarut polar dalam proses fraksinasi. Pemekatan yang dapat dilakukan dengan diuapkan dengan tangas air menggunakan penangas air. Pelarut air dipilih karena air dapat melarutkan garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tanin, gula, gom, pati, protein, lender, enzim, lilin, lemak, pektin, dan zat warna asam organik. Kekurangan menggunakan air adalah zat aktif yang tersari juga zat lain yang tidak diperlukan. Air juga merupakan tempat tumbuh bagi kuman, kapang dan khamir (Depkes 2005).

D. Media

1. Pengertian

Media adalah tempat mikroba untuk tumbuh dan mengandung nutrisi yang tepat untuk kehidupan mikroba yang akan dibiakkan, media tumbuh menyediakan berbagai bahan yang diperlukan mikroba untuk hidup dan memperbanyak diri. Mikroba dapat tumbuh dan berkembangbiak dengan baik, didalam media diperlukan persyaratan tertentu, yaitu media harus mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba. Media harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba. Media harus dalam keadaan steril artinya sebelum ditanami mikroba yang dimaksud, tidak ditumbuhi mikroba lain (Abdurahman 2008).

2. Macam-macam media

Bentuk media ada tiga jenis yaitu media padat, media cair, dan media semi padat atau semi cair. Pertama, media padat. Bahan media padat ditambahkan antara 12-15 g tepung agar-agar per 1000 mL media. Media ini pada umumnya dipergunakan untuk bakteri, ragi, jamur, dan kadang-kadang juga mikroalga. Kedua, media cair. Media cair tidak ditambahkan zat pematat, biasanya media cair dipergunakan untuk pembiakan mikroalga tetapi juga mikroba lain, terutama bakteri dan ragi. Ketiga, media semi padat atau semi cair. Penambahan zat pematat dalam media ini hanya 50% atau kurang dari seharusnya. Media ini

umumnya dipergunakan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup anaerob atau fakultatif (Suriawiria 2005).

3. Klasifikasi media

3.1. Media sintetik. Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri kemoheterotrof. Pada uji kadar vitamin secara mikrobiologis, media yang digunakan harus mengandung semua faktor pertumbuhan yang dibutuhkan oleh bakteri kecuali vitamin yang diuji. Media, bahan media, dan bakteri yang kemudian disatukan, lalu bakteri diamati. Pertumbuhan bakteri yang sebanding dengan kadar asam laktat yang dihasilkan bakteri akan sebanding dengan jumlah vitamin dalam bahan uji (Radji 2011).

3.2. Media kompleks. Media yang sering digunakan secara rutin di laboratorium. Media ini mengandung nutrisi tinggi yang terdiri dari ekstrak ragi, ekstrak daging atau tumbuhan, ataupun protein sederhana dari sumber lain. Vitamin, mineral, dan bahan organik lain yang diperoleh dari ekstrak daging atau ragi merupakan sumber nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Media kompleks yang berbentuk cair disebut *nutrient broth*, sedangkan yang ditambahkan agar disebut *nutrient agar* (Radji 2011).

3.3. Media anaerob. Penanaman bakteri anaerob harus menggunakan media spesial disebut *reducing media* yang mengandung natrium thioglikolat. 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).

3.4. Media biakan khusus. Media ini digunakan untuk menentukan tipe pertumbuhan mikroba dan kemampuannya untuk mengadakan perubahan kimia tertentu. Bakteri aerob membutuhkan CO₂ dengan konsentrasi lebih tinggi ataupun lebih rendah dari pada konsentrasi CO₂ di udara, maka konsentrasi CO₂ pada media ini dinaikkan (Radji 2011).

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

bakteri yang tidak diinginkan dan mendukung pertumbuhan bakteri yang diinginkan. Sebagai contoh, *bismuth sulfate agar* (BSA) digunakan untuk mengisolasi bakteri *Salmonella typhi* dari tinja. Media diferensial memudahkan perbedaan koloni bakteri yang diinginkan dari koloni lain yang tumbuh pada lempeng media yang sama. Karakteristik selektif dan diferensial kadang-kadang di kombinasikan di dalam satu jenis media (Radji 2011).

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

E. Sterilisasi

Sterilisasi adalah tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Alat dan bahan dikatakan steril apabila terbebas dari mikroba. Metode yang digunakan untuk mendapatkan sterilitas pada sediaan farmasi sangat ditentukan oleh sifat sediaan dan zat aktif kandungannya. Metode sterilisasi ada tiga macam yaitu sterilisasi secara fisik, sterilisasi mekanik dan sterilisasi kimiawi. Cara sterilisasi yang umum dilakukan antara lain sterilitas secara fisik yaitu pemanasan, penggunaan sinar X dan penggunaan sinar UV. Sterilitas pada kimia yaitu penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin, dan sterilisasi secara mekanik yaitu penggunaan saringan atau filter. Sterilisasi alat-alat praktikum sangat diperlukan pada penelitian, untuk menghindari adanya kontaminan oleh mikroba yang lain, selain steril aseptis praktikan juga berpengaruh. Cara sterilisasi yang dipilih disesuaikan dengan bahan dan sifat dari alat-alat yang akan digunakan, sehingga tidak mengakibatkan kerusakan.

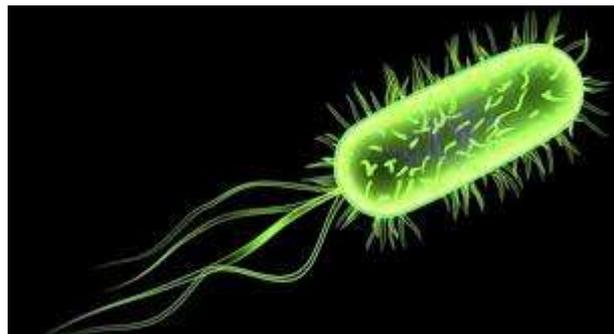
F. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri flora normal pada saluran cerna, yang dapat menyebabkan infeksi atau diare sedang sampai berat pada saluran cerna manusia. Bakteri ini termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* yang dapat hidup dalam usus besar manusia dan hewan, dalam tanah dan dalam air (Jawetz et al. 2012). *Escherichia coli* dapat menyebabkan diare yaitu dengan mekanisme produksi enterotoksin yang secara tidak langsung menyebabkan kehilangan cairan dan dengan invasi yang sebenarnya lapisan epitelium dinding usus, yang menyebabkan peradangan dan kehilangan cairan (Jawetz et al. 2012)

1. Sistematika *Escherichia coli*

Menurut Jawetz et al. (2012) *Escherichia coli* diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi	: Protophyta
Sub Divisi	: Schizomycetea
Class	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>



Gambar 2. *Escherichia coli*

2. Morfologi dan identifikasi

Escherichia coli adalah bakteri Gram negatif dengan ukuran 0,4-0,7 μm , berbentuk batang pendek, berderet seperti rantai, dapat memfermentasikan glukosa dan laktosa membuat asam dan gas. *Escherichia coli* dapat tumbuh baik pada media Mc Conkey dan dapat memecah laktosa dengan cepat, juga dapat

tumbuh pada media agar. *Escherichia coli* dapat merombak karbohidrat dan asam lemak menjadi asam dan gas serta dapat menghasilkan gas karbondioksida dan hidrogen (Pelezar dan Chan 1998). *Escherichia coli* sebagian besar bersifat motil (bergerak) dan beberapa strain memiliki kapsul (Supardi 1999).

Escherichia coli banyak ditemukan di dalam usus halus manusia sebagai flora normal, tetapi bila kesehatan menurun, bakteri ini dapat bersifat patogen terutama akibat toksin yang dihasilkan, *Escherichia coli* umumnya tidak menyebabkan penyakit bila masih berada di usus, tetapi dapat menyebabkan penyakit pada saluran kencing, paru-paru, saluran empedu dan saluran otak (Jawetz e al. 2012). Sebagian besar penyakit yang disebabkan oleh *Escherichia coli* ditularkan melalui makanan yang tidak dimasak dan daging yang terkontaminasi, penularan penyakit dapat terjadi melalui kontak langsung dan biasanya terjadi di tempat yang memiliki sanitasi dan lingkungan yang kurang bersih (Jawetz et al. 2012).

3. Toksin *Escherichia coli*

Galur menghasilkan enterotoksin yang tidak tahan terhadap pemanasan yang dapat menyebabkan meningkatnya sekresi air dan klorida kedalam lumen usus dan diare ringan pada anak-anak. *Escherichia coli* menghasilkan enterotoksin yang disebut *Enterotoksigenik Escherichia coli* (ETEC) dan mempunyai kemampuan untuk memasuki epitel usus yang disebut dengan *Enteroinvasif Escherichia coli* (EIEC). Keadaan kurang baik seperti premature, usia tua, terserang penyakit dan setelah imunisasi, bakteri *Escherichia coli* dapat mencapai saluran darah dan terjadi sepsis. *Escherichia coli* diekstraksi dalam jumlah yang besar didalam feses menyebabkan kontaminasi lingkungan termasuk tanah (Jawetz et al. 2012).

4. Patogenesis

Escherichia coli pertama kali ditemukan oleh Theobold Escherich tahun 1885 dari feses bayi. Bakteri ini bersifat komersial yang terdapat pada saluran pencernaan hewan dan manusia. Bakteri *Escherichia coli* masuk dalam salah satu bakteri indikator sanitasi. *Escherichia coli* patogenik penyebab diare

diklasifikasikan menjadi 5 kelompok: kelompok *Escherichia coli* patogen yaitu *Escherichia coli* enteropatogenetik (EPEC), *Escherichia coli* enterotoksigenik (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasif (EIEC), *Escherichia coli* hemoragik (EHEC), dan *Escherichia coli* enteroagregatif.

5. Pengobatan diare

Infeksi oleh *Escherichia coli* dapat diobati menggunakan antibiotik ciprofloxacin, cotrimoxazole, metronidazole, injeksi gentamicine, dan amoxicillin. Cotrimoxazole merupakan antibiotik yang mengandung kombinasi sulfametoksazol dan trimetoprin. Cotrimoxazole mempunyai spektrum aktivitas luas dan efektif terhadap Gram negatif termasuk *Escherichia coli* yang merupakan bakteri Gram negatif serta salah satu penyebab utama diare akut. (Korompis et al. 2013).

6. Mekanisme antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan. Dalam penggolongannya antibakteri dikenal dengan antiseptik dan antibiotik. Berbeda dengan antibiotik yang tidak merugikan sel-sel jaringan manusia, daya kerja antiseptik tidak membedakan antara mikroorganisme dan jaringan tubuh. Antibiotik adalah zat-zat kimia yang dihasilkan oleh bakteri dan fungi.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi dalam 5 kelompok yaitu: mengganggu metabolisme dinding sel bakteri, menghambat sintesis dinding sel bakteri, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, menghambat sintesis protein sel bakteri, menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri (Odianti 2010).

6.1 Penghambatan metabolisme sel bakteri. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikuti sertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional, sehingga kebutuhan asam folat tidak terpenuhi hal ini bisa menyebabkan bakteri mati.

6.2 Penghambatan sintesis dinding sel. Dinding sel merupakan lapisan luar sel bakteri yang berfungsi mempertahankan struktur sel bakteri. Zat yang dapat merusak dinding sel akan melisiskan dinding sel sehingga dapat mempengaruhi bentuk dan struktur sel, yang pada akhirnya dapat membunuh sel bakteri. Contoh antibiotik beta-laktam, penisilin, sefalosporin, karbapenem, polipeptida, ampisilin.

6.3 Perubahan permeabilitas membran sel bakteri. Membran sel mempunyai peran penting dalam mengatur transportasi nutrisi dan metabolit yang keluar masuk sel. Membran sel juga berfungsi sebagai tempat berlangsungnya respirasi dan aktivitas biosintesis dalam sel. Salah satu kerja dari antibakteri ini adalah mengubah tegangan permukaan sel sehingga merusak permeabilitas dari membran sel mikroba. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, dan nukleotida. Contoh antibiotik polimiksin, amfoterisin B, gramisidin, nistatin.

6.4 Penghambatan sintesis protein sel bakteri. Bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Contoh antibiotik adalah aminoglikosida, makrolida, tetrasiklin, streptogamin, kloramfenikol.

6.5 Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri. Proses replikasi DNA, RNA, dan protein di dalam sel merupakan siklus yang sangat penting bagi kehidupan sel. Beberapa jenis antibiotik dapat mengganggu metabolisme asam nukleat, sehingga mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan sel bakteri. Contoh antibiotik yang mengganggu sintesis DNA adalah metonidasol, kuinolon, novobiosin. Contoh yang mengganggu RNA seperti rifampisin.

G. Antibakteri

1. Antibakteri

Antibakteri merupakan bahan atau senyawa yang khusus digunakan untuk kelompok bakteri. Antibakteri dapat dibedakan berdasarkan mekanisme kerjanya, antara lain yaitu antibakteri yang menghambat pertumbuhan dinding sel, antibakteri yang mengakibatkan perubahan permeabilitas membran sel. Aktivitas antibakteri dibagi menjadi 2 macam yaitu aktivitas bakteriostatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen dalam kisaran luas) (Brooks *et al.* 2005).

2. Metode pengujian aktivitas antibakteri

2.1. Metode difusi. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi. Metode difusi dilakukan dengan menggunakan cakram (*disk*) kertas saring, sumuran atau silinder tidak beralas. Metode dengan sumuran atau silinder, dilakukan dengan memasukkan larutan uji dengan konsentrasi tertentu ke dalam sumuran. Metode cakram kertas saring berisi sejumlah obat yang ditempatkan pada permukaan medium padat, medium sebelum diolesi bakteri uji. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat. Metode difusi agar dipengaruhi oleh faktor kimia, faktor antar obat dan organisme (Jawetz *et al.* 2012).

2.2. Metode dilusi. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode dilusi. Metode dilusi ini berdasarkan pengamatan kekeruhan larutan, dengan metode dilusi dapat ditentukan secara kuantitatif KHM dan KBM. Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap pada media cair maupun padat. Media diinokulasikan terhadap mikroba 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.* 2012).

H. Kotrimoksazol

Kotrimoksazol dalam penelitian ini digunakan sebagai pembanding (kontrol positif) karena memiliki spektrum yang luas sebagai antibakteri dan

memiliki frekuensi terjadinya resistensi yang lebih rendah. Kotrimoksazol merupakan antibiotik yang mengandung kombinasi sulfametoksazol dan trimetoprim (Ganiswara 2005).

Aktivitas antibakteri kombinasi antara sulfametoksazol dan trimethoprim (kotrimoksazol) kombinasi kedua obat ini memberikan efek yang sinergis. Aktivitas kotrimoksazol berdasarkan atas kerjanya pada dua tahap yang berurutan dalam reaksi enzimatik untuk membentuk asam tetrahidrofolat. Sulfametoksazol menghambat masuknya molekul PABA ke dalam molekul asam folat dan trimetoprim menghambat terjadinya reaksi reduksi dari dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat. Tetrahidrofolat penting untuk reaksi-reaksi pemindahan satu atom C, seperti pembentukan basa purin (adenin, guanin, dan timidin) dan beberapa asam amino (metionin, glisin) (Ganiswara 2007).

Efek sinergis antara sulfametoksazol dan trimetoprim diperkirakan dari mekanismenya masing-masing. Rasio yang paling efektif pada dua obat ini untuk sebagian besar mikroorganisme adalah 20 bagian sulfametoksazol : 1 bagian trimetoprim. Kombinasi ini diformulasikan untuk mencapai konsentrasi sulfametoksazol *in vivo* 20 kali lebih besar dari pada trimetoprim. Sifat farmakokinetik sulfonamida yang dipilih untuk kombinasi dengan trimetoprim sangat penting mengingat diperlukannya kadar yang relatif tetap dari kedua obat tersebut dalam tubuh (Ganiswara 2005). Mikroba yang peka terhadap kotrimoksazol adalah *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Aerobacter* spesies *Salmonella*, *Shigella sp*, *Serratia*, dan *Klebsiella sp* (Ganiswara 2007).

I. Landasan Teori

Penyakit diare salah satunya disebabkan oleh infeksi bakteri *Escherichia coli*. *Escherichia coli* termasuk dalam famili Enterobacteriaceae. *Escherichia coli* adalah bakteri Gram negatif dan merupakan flora normal yang banyak ditemukan di saluran usus manusia. Bakteri *Escherichia coli* di dalam usus, bersifat non patogen dan dapat membantu fungsi normal dan nutrisi. Organisme ini menjadi patogen bila mencapai jaringan di luar saluran pencernaan khususnya saluran air

kemih menyebabkan ISK (Infeksi Saluran Kemih). *Escherichia coli* juga dapat menyebabkan infeksi primer pada usus, misalnya diare pada anak (Gillespie & Bamford 2008). Salah satu tanaman yang digunakan untuk obat antibakteri adalah binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). Bagian yang digunakan adalah daun. Tanaman binahong adalah salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan untuk mengobati banyak penyakit diantaranya pengobatan luka bakar, penyakit tifus, radang usus, sariawan, keputihan, pembengkakan hati, pembengkakan jantung, meningkatkan vitalitas, dan daya tahan tubuh (Manoi 2009).

Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) mengandung senyawa alkaloid, polifenol, flavonoid, saponin, dan antrakuinon (Katno 2006). Skrining fitokimia terhadap daun binahong telah dilaporkan oleh Astuti (2012) bahwa pada tanaman binahong memiliki senyawa fenol, flavonoid, alkaloid, terpenoid, steroid, dan saponin. Jurnal penelitian sebelumnya disebutkan bahwa ekstrak *n*-heksana dan etil asetat mengandung terpenoid sedangkan ekstrak etanol 70% daun binahong mengandung saponin, flavonoid dan alkaloid (Aini 2012).

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi (*macerace* : mengairi, melunakkan) merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara serbuk simplisia direndam dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut, akan adanya perbedaan konsentrasi. Cairan penyari yang digunakan bisa berupa air, air-etanol, atau pelarut lain.

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 pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar dan senyawa semi polar akan masuk ke pelarut semi polar (Harborne 2007). Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan tiga pelarut dengan polaritas yang berbeda-beda, pelarut yang digunakan *n*-heksana, etil asetat dan air.

Berdasarkan hasil penelitian Aini (2012), ekstrak yang berpotensi sebagai antibakteri berturut-turut adalah ekstrak etanol 70%, *n*-heksana dan etil asetat.

Hasil skrining fitokimia menunjukkan ekstrak etanol *n*-heksana dan ekstrak etil asetat daun binahong mengandung terpenoid, sedangkan ekstrak etanol 70% daun binahong mengandung saponin, flavonoid dan alkaloid. Menurut Fitriyah *et al.* (2013) menemukan bahwa daun binahong mengandung senyawa alkaloid, polifenol, dan saponin yang bersifat sebagai antibakteri sehingga dapat dimanfaatkan sebagai obat herbal alami. Setiaji (2009) juga melaporkan bahwa ekstrak petroleum eter, etil asetat, dan etanol 70% rhizoma binahong dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hasil uji skrining fitokimia mengandung alkaloid, flavonoid, dan saponin.

Air adalah pelarut universal, yang digunakan untuk ekstrak tanaman dengan produk aktivitas antimikroba. Air sebagai pelarut polar untuk melarutkan senyawa polar misalnya tanin, flavonoid, dan saponin. Golongan senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antibakteri akan larut dalam pelarut polar yaitu air, sehingga dapat diperkirakan bahwa dari ketiga fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air yang paling efektif adalah fraksi air.

Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi dan dilusi, metode difusi dilakukan dengan menggunakan cakram, sumuran atau silinder tak beralas. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat. Fraksi teraktif dari metode difusi yaitu yang memiliki nilai rata-rata diameter hambat terbesar (Bonang dan Koeswardono 1982). Hasil fraksi teraktif yang didapat dari metode difusi, dilanjutkan dengan pengujian antibakteri metode dilusi. Metode dilusi digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan metode dilusi dapat ditentukan secara kuantitatif konsentrasi terkecil suatu obat yang dapat menghambat dan membunuh bakteri.

J. Hipotesis

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

Pertama, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, dapat ditentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, fraksi air dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) paling efektif membunuh *Escherichia coli* ATCC 25922.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang diambil di daerah Palur, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Maret 2017.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). Daun binahong yang digunakan ialah daun yang berwarna hijau segar, kemudian daun yang diperoleh dikeringkan serta dibuat serbuk dan diambil secara acak pada bulan Januari 2017 di Palur, Karanganyar, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah serbuk daun binahong binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang dimaserasi dengan etanol 70% dilanjutkan dengan fraksinasi yang menggunakan *n*-heksana, etil asetat dan air.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun binahong terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel meliputi variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun binahong dengan berbagai konsentrasi atau fraksi ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) diuji antibakteri dengan berbagai konsentrasi.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang mempengaruhi variabel terikat 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 *Escherichia coli* ATCC 25922, kondisi laboratorium (meliputi kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril) dan media yang digunakan dalam penelitian harus steril.

Variabel terikat adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri yang dilihat dari pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media uji, yang dipengaruhi oleh fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol 70% daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun binahong adalah daun yang berwarna hijau segar dan diambil secara acak di daerah Palur, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun binahong adalah daun binahong yang dipetik kemudian dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan kotoran yang masih menempel pada daun binahong, setelah itu daun yang sudah dicuci bersih dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C, setelah kering kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun binahong adalah serbuk daun binahong yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Hasil maserasi kemudian dipekatkan dengan *Rotary evaporator* sampai bebas etanol.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah hasil fraksinasi dari ekstrak etanol 70% daun binahong dengan fraksinasi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut non polar.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksi yang diperoleh dari residu fraksi *n*-heksana daun binahong dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar, kemudian dipekatkan dengan *Rotary evaporator* sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah residu dari fraksi etil asetat daun binahong yang difraksi dengan menggunakan air sebagai pelarut polar, kemudian dipekatkan dengan *waterbath* sehingga didapat fraksi air.

Ketujuh, bakteri uji dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, metode difusi adalah uji aktivitas antibakteri dengan konsentrasi 50%, 25% dan 12,5%. Metode difusi menggunakan media MHA dalam cawan petri yang mempunyai diameter dan ketebalan media tertentu. MHA diratakan permukaannya dengan suspensi bakteri uji yang dioleskan pada permukaan media MHA sampai rata kemudian meletakkan cakram di atas media yang berisi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air serta kontrol negatif DMSO 1% dan kontrol positif kotrimoksazol, lalu mengamati diameter zona hambat.

Kesembilan, metode dilusi adalah uji aktivitas antibakteri untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%. Kontrol negatif adalah fraksi teraktif. Kontrol positif adalah suspensi bakteri. KHM ditentukan dengan mengamati kekeruhan pada tabung reaksi dengan larutan jernih setelah tabung keruh terakhir sedangkan KBM ditentukan dari goresan bakteri yang sudah tidak terdapat pertumbuhan bakteri.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa oven, alat penggiling, ayakan nomor 40, botol cokelat, gelas ukur, Erlenmeyer, batang pengaduk, tabung reaksi, corong kaca, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, Beaker glass, corong pisah, kertas saring, *Moisture Balance*, *Rotary evaporator*, *waterbath*, *autoclave*, timbangan analitik, inkubator, inkas, ose, kapas lidi, cawan petri, pipet volume, pipet tetes, pipet ukur, lampu spiritus, kain flannel, labu destilasi, kertas saring.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis), *Escherichia coli* ATCC 25922, etanol 70%,

n-heksana, etil asetat, aquadest, larutan standart MC Farland 0,5, *Brain Heart Infusion* (BHI), *Endo Agar* (EA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfide Indol Motilitas* (SIM), *Kliger Iron Agar* (KIA), *Lysin Iron Agar* (LIA), sitrat, kloroform, H₂SO₄ pekat, asam asetat, serbuk Mg, reagen dragendrof, anhidrida asetat, amil alkohol, HCl 2N, DMSO 1%, kotrimoksazol, kristal violet, larutan Mordant, alkohol, safranin, minyak imersi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah determinasi tanaman yang digunakan dalam penelitian yaitu tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). Determinasi ini dilakukan di Universitas Sebelas Maret. Determinasi dan deskripsi ini bertujuan untuk menetapkan keberadaan yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi baik secara makroskopi tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap kepustakaan yang dibuktikan di laboratorium.

2. Pengeringan bahan

Daun binahong dicuci bersih terlebih dahulu dengan air mengalir sampai bersih dari kotoran, ditiriskan. Daun binahong yang sudah bersih, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 45°C. Pengeringan ini bertujuan untuk mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri.

3. Pembuatan serbuk

Daun binahong yang sudah kering dihaluskan dengan mesin penggiling kemudian diayak dengan ayakan nomer 40. Pembuatan serbuk bertujuan agar luas partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sampai penyarian berlangsung secara efektif.

4. Penetapan kadar lembab daun binahong

Penetapan kadar lembab daun binahong dilakukan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Caranya temperatur diatur yaitu pada suhu 110°C serta waktu pengeringan secara manual yaitu 15 menit kemudian dimasukkan pada neraca timbang dengan skala 0,00 maka sampel serbuk daun binahong 2 gram dimasukkan. Menunggu sampai alat *Moisture Balance* berbobot konstan yang

dimana menandakan hasil analisa telah selesai. Konsentrasi air akan memenuhi syarat apabila konsentrasi air suatu serbuk simplisia tidak lebih dari 10%.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun binahong metode maserasi

Serbuk daun binahong sebanyak 400 gram dimasukkan ke dalam botol berwarna coklat dengan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 3000 mL. Campuran serbuk daun binahong dan etanol 70% didiamkan selama 5 hari sambil sesekali digojog, kemudian maserat yang didapatkan disaring menggunakan kain flanel dan dipekatkan menggunakan *Rotary evaporator* sampai terbentuk ekstrak kental (Depkes 2008).

6. Uji bebas etanol ekstrak daun binahong

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara ekstrak yang telah pekat diuji sudah bebas etanol atau belum dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol.

7. Fraksinasi dari ekstrak etanol daun binahong

Fraksinasi dilakukan dengan cara ditimbang 10 gram ekstrak daun binahong kemudian dilarutkan dengan pelarut etanol : air sampai terdispersi sempurna, kemudian dilakukan fraksinasi 3 kali dengan pelarut *n*-heksana masing-masing sampai terdispersi sempurna. Proses fraksinasi dilakukan dengan corong pisah, hasil larutan etanol : air sebanyak 75 mL dimasukkan dalam corong pisah kemudian ditambahkan pelarut *n*-heksana sebanyak 75 mL. Fraksi *n*-heksana yang didapat dipekatkan menggunakan *Rotary evaporator* dengan suhu di bawah 40°C. Residu yang didapat dari fraksi *n*-heksana dilanjutkan fraksinasi 3 kali dengan pelarut etil asetat sampai terdispersi sempurna. Fraksi etil asetat dipekatkan dengan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu di bawah 40°C dan fraksi air dipekatkan dengan menggunakan *waterbath* (Depkes 2008).

8. Penetapan persen rendemen

Penetapan % rendemen diperoleh dari hasil ekstrak pekat, kemudian hasil dari ekstrak pekat dibagi dengan berat serbuk lalu dikalikan 100 %.

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{Bobot ekstrak pekat}}{\text{Bobot serbuk}} \times 100\%$$

9. Identifikasi kandungan kimia pada ekstrak dan fraksi daun binahong

Identifikasi senyawa kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi daun binahong. Identifikasi dilakukan dengan uji tabung. Identifikasi kandungan senyawa kimia dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

9.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak, fraksi sebanyak 0,5 gram ditambah 10 mL aquadest dipanaskan selama satu menit, diambil filtratnya. Filtrat ditambah 0,1 gram larutan Mg, ditambahkan 1 mL pelarut amil alkohol. Campuran dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes 1978).

9.2 Identifikasi alkaloid. Ekstrak, fraksi sebanyak 0,5 gram ditambahkan sedikit larutan HCl 2 N, dipanaskan kemudian tambahkan reagen Dragendrof terbentuk endapan berwarna cokelat sampai hitam (Depkes 1987).

9.3 Identifikasi saponin. Ekstrak, fraksi sebanyak 0,5 gram ditambah air panas lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Saponin positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm, pada penambahan 1 tetes HCl 2 N buih tidak hilang (Depkes 1978).

9.4 Identifikasi terpenoid. Ekstrak, fraksi sebanyak 0,5 gram dilarutkan 0,5 mL kloroform, kemudian ditambah 0,5 mL anhidrida asetat dan ditambah 2 mL H₂SO₄ pekat tetes demi tetes melalui dinding tabung. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuk warna cokelat kemerahan (Depkes 1978).

10. Sterilisasi

Seluruh alat yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan disterilkan terlebih dahulu. Alat seperti *Beaker glass*, *Erlenmayer*, gelas ukur, tabung reaksi ditutup dengan kapas. Cawan petri dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen kemudian dimasukkan dalam plastik tahan panas dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan alat-alat seperti jarum ose, pipet, penjepit disterilkan dengan pemanasan api langsung dan seluruh media pembedihan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan sebesar 2 atm.

11. Identifikasi makroskopis *Escherichia coli* pada medium diferensial

Suspensi bakteri uji *Escherichia coli* diinokulasi pada media diferensial *Endo Agar* (EA) dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif

dikatakan bila penampakan koloni merah dengan kilat logam yang permanen dan warna medium merah violet (Volk & Wheller 1988).

12. Identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* dengan pewarnaan Gram

Suspensi bakteri *Escherichia coli* diambil dari media biakan menggunakan jarum ose yang telah dipijarkan, lalu diratakan di atas *object glass*. Larutan zat warna kristal violet diteteskan sebanyak 2 sampai 3 tetes dan didiamkan selama 3 menit. Preparat diberikan akuades mengalir dan dikeringkan. Larutan lugol diteteskan dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan alkohol diberikan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan safranin diberikan selama 3 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Minyak imersi diberikan di atas kaca preparat bakteri. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x100 kali. Pewarnaan dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri tersebut golongan *Escherichia coli*. Bakteri negatif golongan *Escherichia coli* bila sel bakteri berwarna merah, bentuk bacili.

13. Identifikasi *Escherichia coli* dengan uji biokimia

13.1 Media SIM (*Sulfide Indol Motilitas*). Biakan murni bakteri diinokulasi pada permukaan media dengan cara inokulasi tusukan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk menguji adanya sulfide, indol, dan motilitas bakteri. Uji sulfida positif bila berwarna hitam. Uji indol positif bila terbentuk warna merah setelah ditambah reagen Ehrlich. Uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media.

13.2 Media KIA (*Kliger Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng dasar, terdapatnya gas serta terbentuknya warna hitam pada media. Uji positif bila pada bagian lereng akan berwarna merah (ditulis K), bagian dasar berwarna kuning (ditulis A), terbentuknya gas yang ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media (ditulis S+).

13.3 Media LIA (*Lisin Iron Agar*). Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya deaminasi lisin dan sulfida. Selanjutnya diamati pada bagian lereng serta terbentuknya warna hitam pada media. Bila uji positif maka lereng akan berwarna coklat (ditulis R). Berwarna ungu yang berarti suasana basa (ditulis K), berwarna kuning yang berarti suasana asam (ditulis A) disertai terbentuknya warna hitam pada media (ditulis S+).

13.4 Media Sitrat. Biakan bakteri diinokulasikan pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Uji ini positif bila media berwarna biru.

14. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji diambil dari biakan murni pada media *Endo Agar* (EA), diambil kurang lebih 2 ose dan ditanam pada media BHI (*Brain heart Infusion*) diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-4 jam, kekeruhan dibandingkan dengan *Mc Farland* 0,5 dengan jumlah koloni 1×10^7 - 1×10^8 CFU/ml.

15. Pengujian aktivitas antibakteri

Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode difusi dan dilusi. Fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari hasil ekstrak etanol daun binahong secara maserasi diuji aktivitasnya secara mikrobiologi dengan menggunakan bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922. Metode pengujian yang digunakan adalah metode difusi untuk mengetahui diameter zona hambat dan metode dilusi digunakan untuk mengetahui KHM dan KBM.

Pada metode difusi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dibuat masing-masing tiga konsentrasi yaitu 50%, 25% dan 12,5%, kontrol positif (+) yang merupakan antibiotik, dan kontrol negatif (-) berupa DMSO 1%. Bakteri uji yang sudah disiapkan, kemudian diinokulasi merata pada media MHA dengan ketebalan $\pm 0,5$ cm dengan menggunakan kapas lidi steril kemudian didiamkan selama 10 menit agar suspensi biakan terdifusi ke media. Ekstrak etanol, fraksi *n*-

heksana, etil asetat dan air kemudian diteteskan dalam cakram kosong yang telah disterilkan. Cakram dari semua konsentrasi kemudian diletakkan di atas media, sebagai kontrol positif diletakkan pula cakram kortrimoksazol dan sebagai kontrol negatif diletakkan pula cakram yang telah diteteskan DMSO 1%. Masa inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam kemudian dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat yang terbentuk. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri di sekitar cakram menandakan bahwa kandungan kimia daun binahong memiliki daya hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Hasil fraksi teraktif yang didapat dari metode difusi yaitu yang memiliki nilai rata-rata diameter hambat terbesar (Bonang dan Koeswardono 1982). Hasil fraksi teraktif yang didapat dari metode difusi, dilanjutkan dengan pengujian antibakteri metode dilusi.

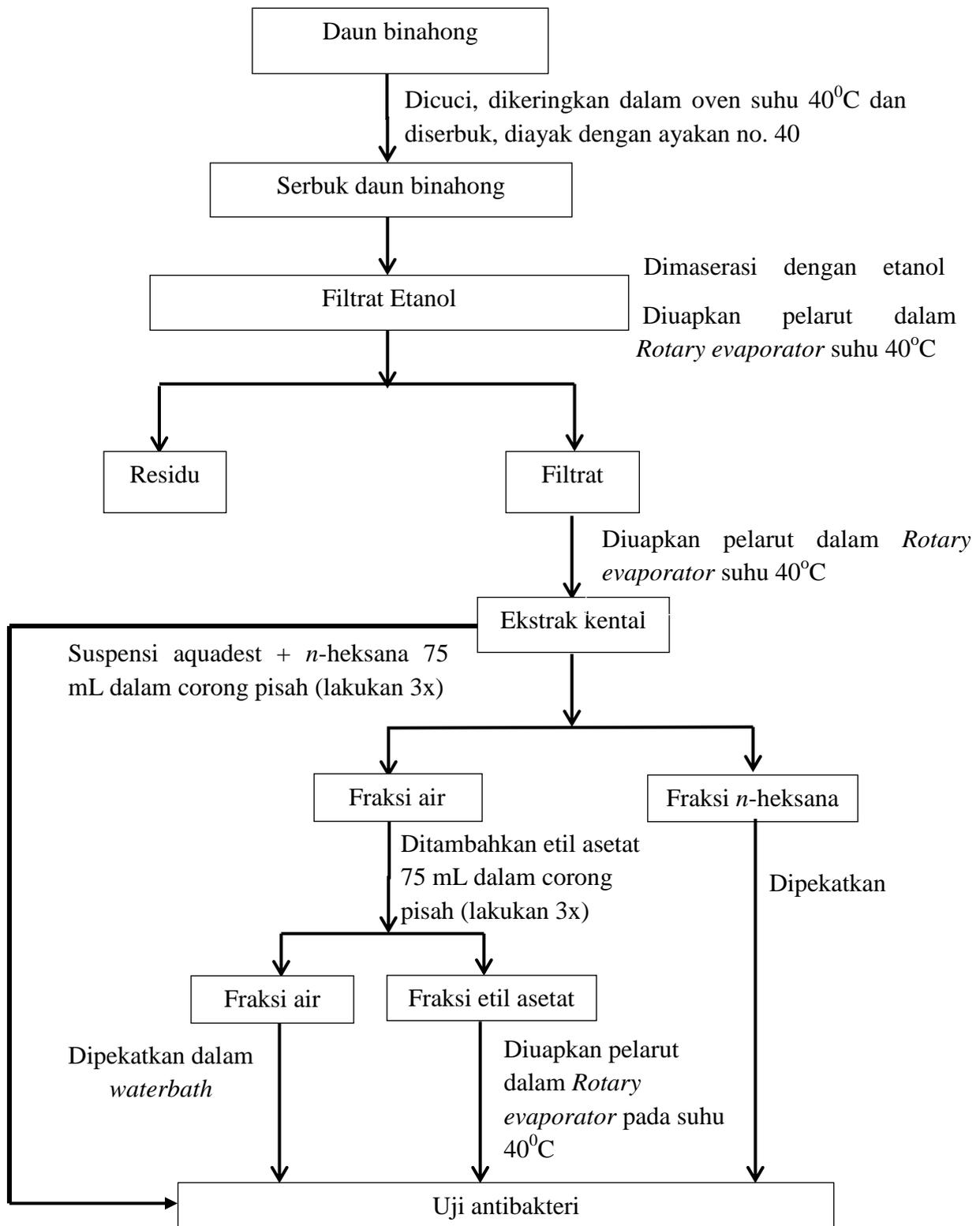
Pengujian antibakteri untuk fraksi teraktif dilakukan dengan metode dilusi. Metode dilusi ini digunakan untuk menentukan KHM dan KBM. Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 12 tabung steril. Masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa konsentrasi yang berbeda yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,09%. Pembuatan larutan stok fraksi teraktif menggunakan DMSO 1%. Metode ini dilakukan secara aseptis dengan menyiapkan 12 tabung steril kemudian diberi media BHI pada setiap tabung sebanyak 0,5 mL kecuali tabung pertama. Secara aseptis dalam tabung 1 ditambahkan 1 mL fraksi teraktif sebagai kontrol negatif, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat dari tabung pertama diambil 0,5 mL dimasukkan tabung kedua, dari tabung kedua diambil 0,5 mL dimasukkan tabung ketiga dan begitu seterusnya sampai tabung ke sebelas. Ambil 0,5 mL dari tabung sebelas kemudian dibuang. Suspensi bakteri uji yang telah disiapkan dimasukkan pada masing-masing tabung 0,5 mL kecuali tabung 1 sebagai kontrol negatif. Tabung 12 sebagai kontrol positif (+) berisi suspensi bakteri. Semua tabung diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C, mengamati adanya kekeruhan pada seri pengenceran sejumlah tabung yang telah diinkubasi, dimana tabung dengan larutan jernih setelah tabung keruh terakhir merupakan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), kemudian menginokulasi dari sejumlah tabung yang hasilnya jernih pada media MHA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam,

sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dari goresan bakteri yang sudah tidak terdapat pertumbuhan bakteri (Bonang dan Koeswardono 1982).

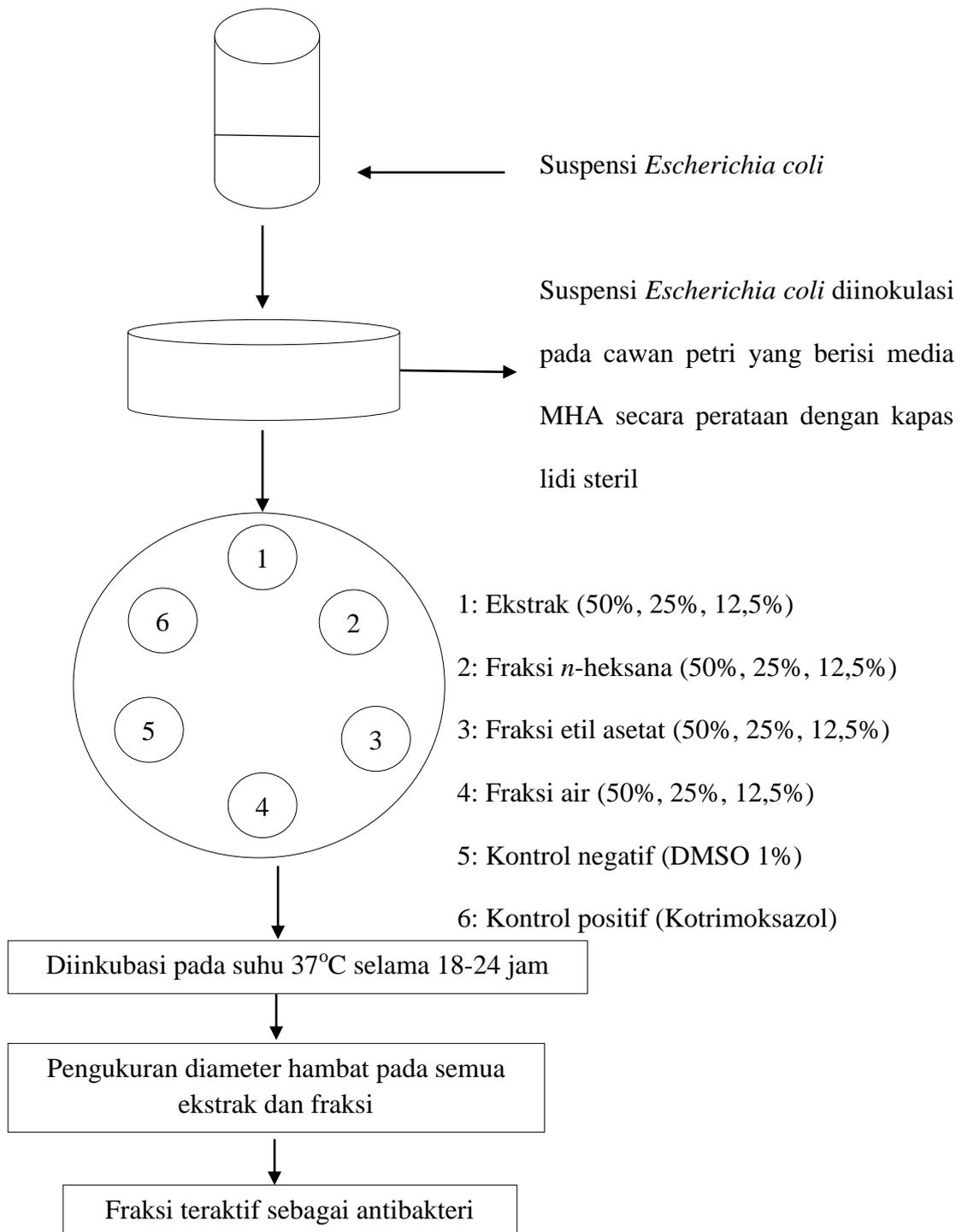
E. Analisis Data

Hasil penelitian dari uji aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dianalisis berdasarkan nilai zona hambat yang terbentuk menggunakan metode difusi. Hasil data yang diperoleh dianalisis menggunakan statistik metode Anova Satu Jalan.

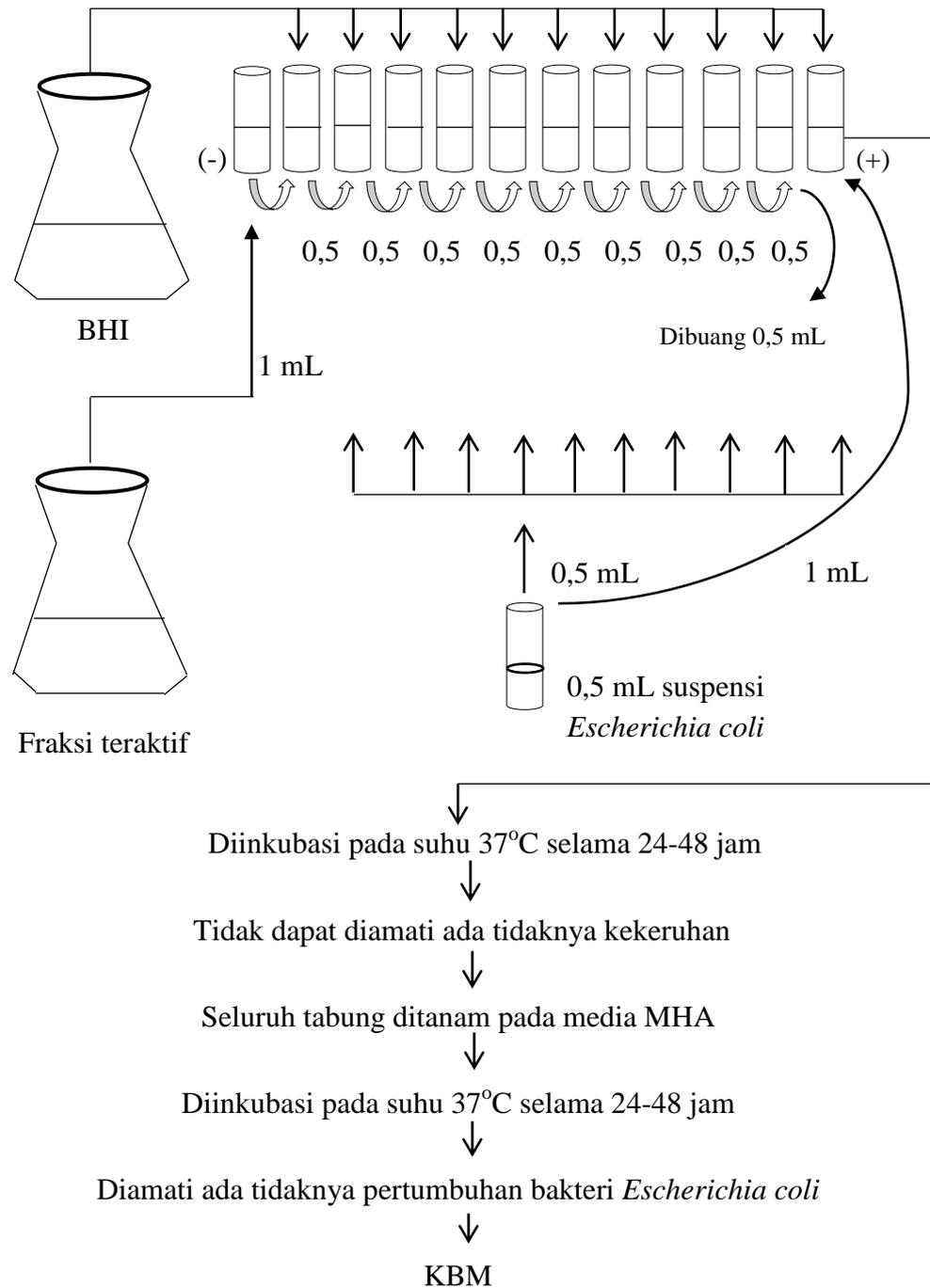
F. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)



Gambar 4. Skema uji *Escherichia coli* dengan metode difusi



Gambar 5. Skema uji *Escherichia coli* dengan metode dilusi

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Identifikasi tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Identifikasi tanaman pada penelitian ini bertujuan untuk mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman yang akan diteliti, mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Identifikasi tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta.

Berdasarkan hasil identifikasi diketahui bahwa tanaman yang digunakan untuk penelitian ini adalah benar tanaman daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). Hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pembuatan serbuk daun binahong

2.1 Pengumpulan bahan. Daun binahong yang digunakan ialah daun yang berwarna hijau segar yang diambil di daerah Palur, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Maret 2017.

2.2 Pengeringan daun binahong. Pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk mengurangi kadar air, sehingga tidak mudah ditumbuhi jamur, bakteri, dan mikroorganisme lainnya, mengurangi aktivitas mikroba yang dapat merusak komponen kimia dalam daun binahong, memudahkan proses pengolahan selanjutnya, dan dapat disimpan dalam waktu yang relatif lama. Pengeringan dilakukan di oven pada suhu 40°C selama 4 hari kemudian dilakukan perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong

No	Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
1	4000	950	23,75

Tabel 1 menunjukkan bahwa daun binahong dengan bobot basah 4000 gram dikeringkan dan diperoleh bobot kering yaitu 950 gram. Persentase bobot

kering terhadap bobot basah sebesar 23,75%. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong dapat dilihat pada lampiran 9.

3. Penetapan kadar lembab serbuk daun binahong

Penetapan kadar lembab serbuk daun binahong dapat dihitung dengan menggunakan alat *moisture balance*. Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun binahong dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab daun binahong menggunakan alat *moisture balance*.

No	Bobot serbuk (g)	Kadar lembab (%)
1	2,00	7,5
2	2,00	7,2
3	2,00	7,3
Rata-rata ± SD		7,3 ± 0,15

Berdasarkan tabel 2 hasil perhitungan kadar lembab serbuk daun binahong yang dilakukan 3 kali replikasi, didapatkan rata-rata persentase kadar lembab yaitu 7,3%. Penetapan kadar lembab tidak boleh lebih dari 10%, kadar lembab yang terlalu tinggi dapat merubah komposisi kimia dari simplisia sehingga menurunkan kualitas simplisia tersebut. Air merupakan media tumbuhnya mikroorganisme yang dapat merusak simplisia. Kadar lembab yang kurang dari 10% dapat mencegah pertumbuhan kapang dan aktivitas enzim sehingga bahan lebih awet serta kandungan zat aktifnya tidak berkurang.

Berdasarkan dari penetapan kadar lembab serbuk daun binahong dapat disimpulkan bahwa serbuk daun binahong ini memenuhi syarat karena persentase kadar lembab serbuk daun binahong kurang dari 10%.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun binahong

Serbuk daun binahong diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Metode ini cocok untuk senyawa yang mudah rusak dengan pemanasan. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Pemilihan konsentrasi pelarut etanol 70% dikarenakan etanol 70% lebih bersifat polar dibandingkan pelarut etanol 96% atau etanol 95%, untuk mengekstraksi senyawa seperti flavonoid dan alkaloid yang bersifat polar maka digunakan pelarut yang bersifat polar juga yakni etanol 70%. Proses maserasi dilakukan selama 5 hari kemudian disaring dengan menggunakan

kain flanel. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Hasil pembuatan ekstrak daun binahong dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Rendemen ekstrak etanol daun binahong

Serbuk daun binahong (g)	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%)
400	78,83	19,71

Berdasarkan tabel 3, tiap botol maserat berisi 400 gram serbuk dilarutkan dalam pelarut etanol 70% sebanyak 3000 mL, didapatkan ekstrak kental adalah 78,83 gram sehingga diperoleh rendemen 19,71%. Ekstrak kental etanol yang didapat kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 10.

5. Uji bebas etanol ekstrak maserasi daun binahong

Ekstrak daun binahong dilakukan uji bebas etanol dengan melakukan uji esterifikasi alkohol. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun binahong dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Uji bebas etanol ekstrak maserasi daun binahong

Esterifikasi	Hasil	Pustaka
Ekstrak + CH ₃ COOH + H ₂ SO ₄ pekat, dipanaskan	Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol	Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol (Depkes 1986)

Hasil uji bebas etanol pada tabel 4 menunjukkan bahwa ekstrak daun binahong tersebut sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 70% yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol. Hasil uji bebas etanol adalah untuk membuktikan bahwa ekstrak daun binahong sudah tidak mengandung etanol.

6. Uji fraksinasi ekstrak etanol daun binahong

Ekstrak daun binahong yang diperoleh dari hasil ekstraksi, kemudian ditimbang sebanyak 10 gram untuk dilakukan fraksinasi sebanyak 3 kali replikasi. Fraksinasi ekstrak etanol daun binahong menggunakan 3 pelarut berdasarkan polaritas yang berbeda. Pelarut yang digunakan adalah *n*-heksana, etil asetat dan air. Tujuan dilakukan fraksinasi adalah untuk memisahkan kandungan senyawa

berdasarkan tingkat kepolarannya. Senyawa non polar akan terekstraksi dalam pelarut *n*-heksana, senyawa semipolar akan terekstraksi dalam pelarut etil asetat dan senyawa polar akan terekstraksi dalam pelarut air. Ekstrak hasil maserasi yang telah dipekatkan ditimbang 10 gram kemudian dilarutkan dengan etanol:air (1:1) sebanyak 75 mL kemudian dipisahkan di corong dengan menambahkan *n*-heksana 75 mL dan gojog selama 10 menit, sesekali corong pisah dibuka untuk mengeluarkan gas. Residu yang didapat dari *n*-heksana kemudian dilanjutkan menggunakan pelarut etil asetat dengan cara yang sama. Fraksinasi dilakukan replikasi sebanyak 3 kali agar senyawa yang terkandung dalam ekstrak dapat benar-benar tertarik dalam pelarut. Hasil fraksinasi daun binahong dapat dilihat pada tabel 5. Perhitungan rendemen fraksinasi dapat dilihat pada lampiran 11.

Tabel 5. Rendemen hasil fraksinasi

Nama pelarut	Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Persen rendemen (%)
<i>n</i> -heksana	10,00	1,93	19,3
	10,00	1,98	19,8
	10,00	1,96	19,6
	Rata-rata	1,96	19,56
Etil asetat	10,00	2,64	26,4
	10,00	2,57	25,7
	10,00	2,73	27,3
	Rata-rata	2,65	26,46
Air	10,00	7,03	70,3
	10,00	6,98	69,8
	10,00	7,09	70,9
	Rata-rata	7,03	70,3

Berdasarkan tabel 5 dapat dilihat bahwa perhitungan hasil persentase rendemen fraksi air lebih besar dibandingkan fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat, sedangkan fraksi etil asetat lebih besar dari pada *n*-heksana. Rendemen setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun binahong berbeda. Air merupakan pelarut yang bersifat polar, sehingga dapat diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun binahong lebih banyak mengandung senyawa yang bersifat polar, ini berarti senyawa polar yang terkandung pada ekstrak daun binahong lebih banyak dibandingkan senyawa yang

lain. Organoleptis fraksi *n*-heksana berwarna kehijauan, fraksi etil asetat berwarna hijau tua dan fraksi air berwarna cokelat tua.

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi teraktif daun binahong

Identifikasi kandungan ekstrak dan fraksi daun binahong dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan terpenoid. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun binahong dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi daun binahong

Senyawa	Hasil		Keterangan			
	Pengamatan	Pustaka	Ekstrak	Fraksi <i>n</i> -heksana	Fraksi etil asetat	Fraksi air
Flavonoid	Larutan berwarna merah pada lapisan amil alkohol	Reaksi positif bila timbul + warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes 1978)	(+)	(-)	(-)	(+)
Alkaloid	Terbentuk kekeruhan atau endapan warna coklat hitam dan ada endapan kuning	Kekeruhan atau endapan warna coklat (Depkes 1978)	(+)	(-)	(+)	(+)
Saponin	Terdapat busa yang mantap + HCl, busa tidak hilang selama 30 menit setinggi 2,5 cm	Terdapat busa yang mantap setinggi 1-5cm + HCl, busa tidak hilang selama 30 menit (Depkes 1978)	(+)	(-)	(-)	(+)
Terpenoid	Terbentuk warna cokelat kemerahan	Terbentuk warna cokelat kemerahan	(+)	(+)	(-)	(-)

Keterangan : (+) = Terbentuk perubahan

(-) = Tidak terbentuk perubahan

Berdasarkan tabel 6, hasil identifikasi kandungan kimia yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak daun binahong mengandung flavonoid, alkaloid, saponin dan terpenoid. Sementara, fraksi teraktif daun binahong mengandung flavonoid, alkaloid dan saponin. Gambar hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak dan fraksi teraktif daun binahong dapat dilihat pada lampiran 5.

8. Identifikasi bakteri uji

8.1 Identifikasi bakteri *Escherichia coli* secara makroskopis. Bakteri uji *Escherichia coli* diinokulasi pada media diferensial *Endo Agar* (EA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tujuan dari inokulasi ini yaitu untuk menumbuhkan bakteri yang diambil dari sediaan murni. Berdasarkan pengamatan koloni yang dihasilkan berwarna merah dengan kilat logam yang permanen. Warna koloni merah disebabkan bakteri *Escherichia coli* dan koliform memetabolisme laktosa menjadi aldehid dan asam sehingga aldehid bereaksi dengan fuchsin. Koloni kilat logam disebabkan *Escherichia coli* bereaksi dengan fuchsin kristal sehingga fuchsin tersebut diserap. Gambar hasil identifikasi secara makroskopis dapat dilihat pada lampiran 8.

8.2 Identifikasi mikroskopis bakteri *Escherichia coli* dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri uji *Escherichia coli* tersebut termasuk golongan Gram negatif. Berdasarkan hasil identifikasi mikroskopis bakteri *Escherichia coli* diperoleh hasil dengan sel bakteri berwarna merah, bentuk bacilli, ini menunjukkan bahwa bakteri uji merupakan *Escherichia coli* golongan Gram negatif. Penetasan kristal violet (Gram A) di atas preparat menyebabkan kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri. Penetasan larutan Mordant (lugol iodine/Gram B) menyebabkan adanya ikatan kristal violet dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Penetasan alkohol (Gram C) menyebabkan pori-pori pada Gram negatif yang memiliki lapisan banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks kristal violet tidak menempel pada dinding sel bakteri, menyebabkan Gram negatif menjadi bening. Penetasan safranin (Gram D) akan mewarnai sel Gram negatif menjadi warna merah. Gambar hasil identifikasi mikroskopis dapat dilihat pada lampiran 8.

8.3 Identifikasi biokimia bakteri *Escherichia coli*. Uji biokimia bakteri merupakan suatu cara untuk mengidentifikasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologisnya. Bakteri ditanam dalam media SIM, KIA, LIA, dan Sitrat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil identifikasi uji

biokimia dapat dilihat pada tabel 7 dan gambar hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 8.

Tabel 7. Hasil identifikasi biokimia pada *Escherichia coli*

Pengujian	Hasil	Pustaka
SIM	- + +	- + +
KIA	A/AGS (-)	A/AGS (-)
LIA	K/KS (-)	K/KS (-)
Sitrat	-	-

Keterangan :

SIM : *Sulfida Indol Motility*

KIA : *Klinger's Iron Agar*

LIA : *Lysin Iron Agar*

(+) : Reaksi Positif

(-) : Reaksi Negatif

A : Acid (kuning)

K : Alkali (merah atau ungu)

S : Sulfida (hitam)

G : Gas

Medium *Sulfida Indol Motility* (SIM) untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pada pengujian SIM menunjukkan bahwa hasil sulfida negatif (-), artinya *Escherichia coli* tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida yang ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media. Hasil uji indol positif setelah ditambahkan tiga tetes reagen erlich A dan erlich B dengan terbentuknya warna merah muda pada permukaan yang artinya bakteri *Escherichia coli* membentuk indol dari tryptopan sebagai sumber karbon. Tryptopan merupakan suatu asam amino esensial yang dapat mengalami reaksi oksidasi dengan cara kegiatan enzimatik bakteri. Uji motilitas diperoleh hasil positif, ditunjukkan dengan adanya penyebaran pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada media SIM.

Medium *Klinger's Iron Agar* (KIA) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas, dan pembentukan sulfida. Hasil yang diperoleh yaitu A/AGS (-), A/A artinya pada lereng dan dasar media berwarna kuning yang menunjukkan bahwa bakteri *Escherichia coli* mampu memfermentasi glukosa dan laktosa. Medium *Klinger's Iron Agar* (KIA) mengandung laktosa 1% dan glukosa 0,1%, dan *phenol red* sebagai indikator. Perubahan warna media menjadi kuning disebabkan oleh aktivitas fermentasi bakteri yang mengubah pH media menjadi asam dimana indikator pada media adalah *phenol red* (dalam suasana asam). G artinya terdapat gas sehingga menyebabkan media terangkat, S(-) artinya uji hidrogen sulfida (H₂S) negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada

media KIA karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media KIA sehingga tidak terbentuk warna hitam antara dasar dan lereng.

Medium *Lysin Iron Agar* (LIA) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Pengujian bakteri *Escherichia coli* pada media LIA menunjukkan hasil K/KS(-), K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) di seluruh media. S(-) artinya uji H₂S negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA.

Medium sitrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian bakteri *Escherichia coli* pada media sitrat menunjukkan hasil negatif sehingga warna media tetap hijau. Hal ini menunjukkan bahwa *Escherichia coli* tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal, dalam medium sitrat terdapat indikator BTB (*Bromo Thymol Blue*) yang merupakan indikator pH, jika mikroba mampu menggunakan sitrat menyebabkan suasana asam dan basa akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan hasil bahwa bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini *Escherichia coli* ATCC 25922.

9. Pembuatan suspensi bakteri

Prinsip pembuatan suspensi bakteri uji yaitu pengambilan bakteri dari biakan murni pada media *Nutrient Agar* (NA) diambil satu ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi media BHI (*Brain Heart Infusion*) dengan pengenceran 1:1000, setelah itu di inkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam, kemudian kekeruhan disesuaikan dengan standart Mc Farland 0,5. Tujuan distandarkannya dengan Mc Farland 0,5 yaitu untuk mengetahui kisaran jumlah koloni bakteri yang terdapat pada suspensi bakteri, bila tidak distandarkan dengan Mc Farland 0,5 dimungkinkan bakteri terlalu banyak atau terlalu sedikit sehingga mempengaruhi hasil penelitian.

10. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksinasi daun binahong terhadap *Escherichia coli* secara difusi

Hasil sediaan dari ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun binahong dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* menggunakan metode difusi untuk mengetahui terbentuk atau tidaknya daerah jernih di sekeliling cakram (disk) yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan larutan uji terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui fraksi yang paling aktif yang mempunyai daya hambat yang paling baik terhadap *Escherichia coli*.

Pengujian aktivitas sediaan dari ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun binahong dilakukan terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi masing-masing 50%, 25%, 12,5% dan kotrimoksazol sebagai kontrol positif dan DMSO 1% sebagai kontrol negatif. Perhitungan konsentrasi larutan dapat dilihat pada lampiran 12. Hasil uji antibakteri dengan metode difusi terhadap *Escherichia coli* dapat dilihat pada tabel 8. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 15.

Tabel 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksinasi daun binahong terhadap *Escherichia coli* secara difusi

Sampel	Konsentrasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata (mm) ± SD
		Replikasi			
		1	2	3	
Fraksi <i>n</i> -heksana	50%	13	12,5	12,8	12,76 ± 0,25
Fraksi Etil asetat	50%	14	14,1	13,5	13,86 ± 0,32
Fraksi Air	50%	18,8	19,5	19	19,1 ± 0,36
Ekstrak	50%	12	12,3	12,5	12,26 ± 0,25
Fraksi <i>n</i> -heksana	25%	11,2	10,5	11,7	11,13 ± 0,60
Fraksi Etil asetat	25%	13	12,6	13	12,86 ± 0,23
Fraksi Air	25%	16,1	15,8	15,6	15,83 ± 0,25
Ekstrak	25%	9	9,5	9,8	9,43 ± 0,40
Fraksi <i>n</i> -heksana	12,5%	0	0	0	0 ± 0
Fraksi Etil asetat	12,5%	0	0	0	0 ± 0
Fraksi Air	12,5%	13,5	13,2	13,1	13,26 ± 0,20
Ekstrak	12,5%	0	0	0	0 ± 0
Kontrol (+)	4,8%	31	31,9	31,5	31,46 ± 0,45
Kontrol (-)	1%	0	0	0	0 ± 0

Keterangan :

Kontrol (-) : DMSO 1%

Kontrol (+) : Kotrimoksazol 4,8%

Luas daerah hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ditunjukkan dengan terbentuknya daerah jernih di sekeliling cakram (disk) pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Aktivitas antibakteri suatu senyawa dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain kandungan senyawa antibakteri, daya difusi ekstrak, jenis bakteri yang dihambat dan konsentrasi ekstrak (Jawetz et al. 1986). Konsentrasi ekstrak yang semakin tinggi menyebabkan terbentuknya zona hambatan yang semakin besar. Hal ini juga diperkuat oleh Ajizah (2004) menyatakan bahwa semakin pekat konsentrasi suatu ekstrak, maka senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak tersebut semakin banyak, sehingga memberikan pengaruh terhadap diameter zona bening atau zona hambat yang terbentuk. Menurut Suriawiria (2005), berdasarkan zona hambat yang terbentuk maka aktivitas antimikroba dapat digolongkan menjadi beberapa golongan yaitu lemah (zona hambat < 5 mm), sedang (zona hambat antara 5-10 mm), kuat (zona hambat 10-20 mm), dan tergolong sangat kuat (zona hambat > 20 mm).

Daya hambat antibakteri fraksi *n*-heksana pada konsentrasi 50% (12,76 mm), 25% (11,13 mm) termasuk kuat, sementara pada konsentrasi 12,5% (0 mm). Daya hambat antibakteri fraksi etil asetat pada konsentrasi 50% (13,86 mm), 25% (12,86 mm) termasuk kuat, sementara pada konsentrasi 12,5% (0 mm). Daya hambat antibakteri fraksi air pada konsentrasi 50% (19,1 mm), 25% (15,83 mm), dan 12,5% (13,26 mm) termasuk kuat. Dengan demikian, diketahui bahwa konsentrasi 50% pada fraksi air merupakan konsentrasi efektif untuk menghambat bakteri *Escherichia coli*. Konsentrasi tersebut daya antibakterinya dikategorikan kuat dengan diameter hambat yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat, untuk memastikan fraksi air adalah fraksi paling aktif maka dilanjutkan ke uji analisis data.

Analisis data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi diuji secara statistik *Analisis of Varian* (ANOVA) *oneway*. *Analisis of Varian* (ANOVA) *oneway* digunakan untuk membandingkan fraksi pada tiap konsentrasi dan aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, ekstrak etanol, kontrol positif, dan kontrol negatif guna mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji *One-Sample Kolmogorove-Smirnov* diperoleh signifikansi $0,125 > 0,05$ maka H_0 diterima, data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilakukan *analisis of variansi* (ANOVA). Hasil uji *Analisis of Varian* (ANOVA) *oneway* tabel diameter hambat diperoleh $F = 2624,955$ dengan probabilitas $0,000 < 0,05$ yang berarti dari tiap sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *Escherichia coli* ATCC 25922. Pada tabel Tukey HSD terdapat tanda * pada *Mean Difference* menunjukkan bahwa perbedaan diameter hambat aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* terbagi dalam 9 subsets, subset 1 terdapat *n*-heksana 12,5%, etil asetat 12,5%, ekstrak 12,5%, dan DMSO 1% (kontrol negatif). Subset 2 terdapat ekstrak 25%. Subset 3 terdapat *n*-heksana 25%. Subset 4 terdapat ekstrak 50%, *n*-heksana 50%, dan etil asetat 25%. Subset 5 terdapat *n*-heksana 50%, etil asetat 25%, dan air 12,5%. Subset 6 terdapat air 12,5% dan etil asetat 50%. Subset 7 terdapat air 25%. Subset 8 terdapat air 50%. Subset 9 terdapat antibiotik kotrimoksazol (kontrol positif). Berdasarkan berbagai subsets diketahui bahwa semakin kekanan semakin besar diameter hambatannya. Diameter hambat diketahui dari subsets 1-9 mempunyai perbedaan nyata dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Hasil analisis Tukey test, Bonferroni test, dan *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada lampiran 20.

Berdasarkan tabel 8 dan analisis data maka dapat disimpulkan bahwa fraksi air merupakan fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan mempunyai aktivitas antibakteri terbesar dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan ekstrak etanol daun binahong. Ekstrak etanol memiliki aktivitas penghambatan paling rendah, walaupun ekstrak etanol mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun binahong, akan tetapi senyawa-senyawa tersebut ternyata tidak mampu bekerja secara sinergis sehingga daya hambat yang terbentuk lebih kecil. Fraksi *n*-heksana mampu menarik senyawa terpenoid yang memiliki aktivitas antibakteri yang belum bisa bekerja secara optimum sehingga aktivitas antibakterinya masih rendah. Fraksi air memiliki daya hambat paling besar terhadap *Escherichia coli*, adanya kemungkinan fraksi air mampu menarik

senyawa yang paling aktif sebagai antibakteri dibandingkan dengan fraksi yang lain. Senyawa aktif dalam fraksi air yaitu saponin, alkaloid, dan flavonoid. Hal ini diduga adanya kandungan senyawa kimia yang bersifat polar di dalam fraksi air yang lebih optimum untuk menghambat pertumbuhan bakteri.

Senyawa flavonoid terdapat dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin saja terdapat dalam satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida dan larut dalam air, dengan demikian fraksi air merupakan pelarut yang baik untuk menarik glikosidanya. Hal ini diperkuat oleh Tian *et al.* (2009) menyatakan bahwa flavonoid dalam bentuk glikosida memiliki sifat yang efektif sebagai antibakteri. Menurut Gunawan dan Mulyani (2004), senyawa flavonoid memiliki aktivitas sebagai antibakteri berdasarkan mekanisme flavonoid yang dapat mendenaturasikan protein sel dan merusak membran sel mikroorganisme dan bersifat irreversible atau tidak dapat diperbaiki lagi sehingga pertumbuhan mikroba terhambat. Saponin adalah golongan senyawa glikosida yang umumnya larut dalam pelarut polar, misalnya air dan etanol (Voigt 1995). Saponin juga merupakan senyawa aktif permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika di kocok dalam air, penyarian senyawa saponin akan memberikan hasil yang lebih baik sebagai antibakteri bila menggunakan pelarut etanol 70%. Kumalasari dan Sulistyani (2011) menyatakan bahwa mekanisme saponin sebagai antibakteri adalah melibatkan pembentukan kompleks dengan sterol pada membran plasma sehingga menghancurkan semi permeabilitas sel, kemudian mengarah pada kematian sel. Alkaloid umumnya larut dalam pelarut lipofil, garamnya larut dalam pelarut organik (misal sebagai sitrat) sehingga biasa diekstraksi dengan pelarut yang hidrofil misalnya campuran etanol dan air (Voigt 1995). Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri adalah alkaloid mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan sel bakteri tidak terbentuk secara utuh karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding selnya hanya meliputi membran sel sehingga menyebabkan kematian sel pada bakteri tersebut (Alamsyah 2014).

Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 1%, dimana pelarut ini merupakan pelarut yang digunakan dalam pembuatan seri konsentrasi ekstrak,

fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air. Berdasarkan hasil penelitian Diah *et al.* (2012) mengemukakan penggunaan DMSO di atas 5%-20% dapat menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri atau mikroorganisme lain, maka dari itu DMSO 1% perlu diikuti sertakan dalam pengujian aktivitas antibakteri. Hasil dari pengujian DMSO 1% tidak memiliki aktivitas sehingga daya hambat yang terbentuk benar-benar merupakan aktivitas dari masing-masing fraksi dan ekstrak etanol dari daun binahong.

11. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dilakukan dengan metode dilusi untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menggunakan sediaan fraksi paling aktif yaitu fraksi air daun binahong yang diperoleh dari metode difusi. Pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi air daun binahong terhadap *Escherichia coli* dengan konsentrasi larutan masing-masing 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, dan 0,09%, kontrol positif dan kontrol negatif. Jumlah bakteri *Escherichia coli* yang digunakan disesuaikan kekeruhannya dengan standar *Mc Farland 0,5* dalam medium BHI mempunyai perbandingan 1:1000 yang kemudian dicampur dengan fraksi air. Kotrimoksazol yang digunakan sebagai pembanding dalam metode difusi juga dilakukan pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian kotrimoksazol dimulai dari 4,8%, 2,4%, 1,2%, 0,6%, 0,3%, 0,15%, 0,075%, 0,0375%, 0,01875%, dan 0,009375% kontrol positif dan kontrol negatif. Perhitungan pembuatan larutan stok dilusi dan konsentrasi pembanding kotrimoksazol dapat dilihat pada lampiran 13 dan lampiran 14.

KHM dapat ditentukan dari kadar terendah larutan uji yang terlihat jernih, aktivitas antibakteri diketahui dari kekeruhan masing-masing tabung uji yang kemudian digoreskan dalam media MHA. Akan tetapi nilai KHM pada penelitian ini tidak dapat ditentukan karena sampel fraksi yang digunakan berwarna cokelat tua dan kekeruhannya tinggi sehingga mempersulit pengamatan, sehingga untuk menentukan KBM masing-masing tabung larutan uji dilakukan penggoresan pada

media MHA, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi dapat dilihat pada tabel 9. Gambar hasil uji dilusi fraksi air dapat dilihat pada lampiran 16 dan uji dilusi kotrimoksazol pada lampiran 17.

Tabel 9. Hasil uji dilusi fraksi air dan kotrimoksazol

No	Konsentrasi (%)	Fraksi air Replikasi			Konsentrasi (%)	Kotrimoksazol Replikasi		
		I	II	III		I	II	III
1	50	-	-	-	4,8	-	-	-
2	25	-	-	-	2,4	-	-	-
3	12,5	-	-	-	1,2	-	-	-
4	6,25	-	-	-	0,6	-	-	-
5	3,12	+	+	+	0,3	-	-	-
6	1,56	+	+	+	0,15	-	-	-
7	0,78	+	+	+	0,075	-	-	-
8	0,39	+	+	+	0,0375	+	+	+
9	0,19	+	+	+	0,01875	+	+	+
10	0,09	+	+	+	0,009375	+	+	+
11	K (+)	+	+	+	K (+)	+	+	+
12	K (-)	-	-	-	K (-)	-	-	-

Keterangan:

(+) = ada pertumbuhan koloni bakteri

(-) = tidak ada pertumbuhan koloni bakteri

Hasil pengujian pada tabel 9 menunjukkan bahwa KHM sulit diamati karena masing-masing fraksi yang digunakan berwarna keruh sehingga perlu dilakukan penggosokan pada media MHA untuk mengetahui KBM. KBM dari fraksi air daun binahong terhadap bakteri *Escherichia coli* adalah 6,25%, sedangkan kotrimoksazol mampu membunuh pada konsentrasi 0,075%. Semakin tinggi konsentrasi sediaan uji maka semakin tinggi pula kandungan zat aktif di dalamnya sehingga aktivitas antibakteri akan semakin bertambah. Sediaan uji yang memiliki KBM semakin kecil, menandakan semakin potensialnya sediaan tersebut sebagai antibakteri karena dengan konsentrasi kecil sediaan uji sudah dapat membunuh bakteri.

KHM merupakan konsentrasi terendah dari fraksi air yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. Nilai KHM berbanding terbalik dengan nilai sensitivitas bakteri, yakni semakin rendah nilai KHM maka nilai sensitivitas bakteri semakin tinggi. KBM dalam penelitian ini dapat diketahui dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri setelah diuji goresan pada media MHA. Hasil

positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan koloni *Escherichia coli* berwarna putih kehijauan pada media MHA.

Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa perbandingan konsentrasi fraksi air dari daun binahong sebagai fraksi teraktif belum mampu mengalahkan obat sintetik yaitu kotrimoksazol sebagai antibakteri. Kotrimoksazol dipilih sebagai pengujian daya antibakteri karena mempunyai spektrum luas sebagai antibakteri, memiliki frekuensi terjadinya resistensi yang lebih rendah. Aktivitas antibakteri kombinasi antara sulfametoksazol dan trimethoprim (kotrimoksazol) dari kedua obat ini memberikan efek yang sinergis. Aktivitas kotrimoksazol berdasarkan atas kerjanya pada dua tahap yang berurutan dalam reaksi enzimatik untuk membentuk asam tetrahidrofolat. Sulfametoksazol menghambat masuknya molekul PABA (asam para amino benzoat) ke dalam molekul asam folat dan trimetoprim menghambat terjadinya reaksi reduksi dari dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat. Tetrahidrofolat penting untuk reaksi-reaksi pemindahan satu atom C, seperti pembentukan basa purin (adenin, guanin, dan timidin) dan beberapa asam amino (metionin, glisin) (Ganiswara 2007).

BAB V

KESIMPULAN DAN PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

Pertama, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, fraksi air dari ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) merupakan fraksi paling aktif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, fraksi air mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) 6,25%.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melakukan uji aktivitas antimikroba daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap mikroorganisme lainnya.

Kedua, perlu dilakukan uji aktivitas antibakteri daun binahong dengan metode penyari dan pelarut yang lain untuk mengetahui metode yang lebih efektif.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurrahman D. 2008. *Biologi Kelompok Pertanian dan Kesehatan*. Bandung: Grafindo Media Pertama.
- Aini. 2012. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak n-Heksana, Etil Asetat, dan Etanol Daun Binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis) terhadap Pertumbuhan Psudomonas aeruginosa Secara In Vitro* [Skripsi]. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Ajizah A. 2004. *Sensitivitas Salmonella typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L. Jurnal Biologi Pertanian* 1:31-8.
- Alamsyah HK *et al.* 2014. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut (J.G.Agardh) dari Perairan Pulau Pajang Jepara terhadap bakteri Escherichia coli dan Staphylococcus epidermis. Journal Of Marine Research* 3:60-78.
- Astuti SM. 2012. *Skrining Fitokimia dan Uji Aktifitas Antibiotika Ekstrak Etanol Daun, Batang, Bunga dan Umbi Tanaman (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis)*. Universitas Malaysia Pahang (UMP).
- Bonang, G., dan Koeswardono, 1982, *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium Dan Klinik*. PT. Gramedia, Jakarta, hlm 77-78.
- Brooks, G.F., J. S Butel dan S. A. Morse. 2005. *Medical Microbiology*. Mc Graw Hill, New York.
- Dalimartha S. 2008. *1001 Resep Herbal*. Jakarta: Penebar Swadaya. Hlm 11-12
- Departemen Kesehatan. 1978. *Materia Medika Indonesia*. Jilid IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan RI. 1986. *Sediaan Galenika*. Departemen Kesehatan Indonesia RI. Hlm 5-12.
- Departemen Kesehatan. 1987. *Sediaan Galenik*. Jilid I. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Departemen Kesehatan. 2005. *Materia Medika Indonesia*. Jilid III. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. hlm 301-304.
- Departemen Kesehatan RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Ed ke-1. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan RI. 2008. *Pengelolaan Pasca Panen Tanaman Obat*. Balai Penelitian Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.

- Departemen Kesehatan RI. 2011. *Farmakope Herbal Indonesia*. Ed ke-1. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Suplemen II.
- Diah H, Maipa D, Marlina, Meilan. 2012. Skrining Aktivitas Antibakteri Beberapa Biota Laut dari Perairan Pantai Painan Sumatera Barat. Sumatera Barat: Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang.
- Fitriyah N, Mahendrata P.K, M. Afif A.Y, Mulyadi, Nila W, Joko K. 2013. *Obat Herbal Antibakteri Ala Tanaman Binahong*. Surakarta: Prodi D-III Keperawatan, STIKes Kusuma Husada.
- Ganiswara, 2005. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Jakarta : Gaya Baru. Hlm 571-596
- Ganiswara, 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. Jakarta : Gaya Baru. Hlm 585-598
- Gillespie SH, Bamford KB. 2008. *At Glance Mikrobiologi Medis dan Infeksi*. Edisi ketiga. Astikawati R, Safitri A, editor. Jakarta : Erlangga.
- Ginns, C. A. 2000. *Colonization o the Respiratory Tract by a Virulent Strain of Avian Escherichia coli Requires carriage of a Conjugative Plasmid. Infection and Immunity*. Vol 3(68). Hal 1535-1541. Terdapat pada <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Diakses tanggal 19 Maret 2011.
- Gunawan D, Mulyani S. 2004. *Ilmu obat alam (Farmakognosi)*. Jilid ke-1 Yogyakarta: Penebar Swadaya. Hlm 9, 106.
- Hambali, Erliza, dan Ariyanti. 2005. *Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (Aloe bardadensis Miller) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus ATCC 25923 dan Escherichia coli ATCC 25922. Jurnal Biologi* 1:1-4.
- Harborne, J.B. 2006. *Metode Fitokimia, Penuntunan dan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Edisi III. Penerbit ITB, Bandung.
- Harborne JB. 2007. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Ed ke-4. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah; Bandung: ITB Press.
- Hariana HA. 2002. *Tumbuhan Obat & Khasiatnya*. Edisi revisi. Jakarta :Penebar Swadaya.
- Hariana A. 2004. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Ed ke-1. Gerard Bonang, penerjemah; Jakarta: ECG. Hlm 239,241-243. Terjemahan dari: *Review of Medical Microbiology*.

- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Aryandhito WN, Dian R, penerjemah. Ed ke-25. Jakarta: ECG.
- Katno, Dyah S, Rohmat M, Harto W. 2006. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Ed ke-6. Jakarta: Departemen Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Balai Penelitian Tanaman Obat. Hlm 16-17.
- Korompis F, Tjtosantoso H, Goenawi L, 2013, *Studi Penggunaan Obat Pada Penderita Diare Akut di Instalasi rawat Inap Blu RSUP prof. Dr.R.D Kandou manado periode Januari-Juni 2012*. *Jurnal Farmasi- UNSRAT* 2:Halaman 42-50.
- Kumalasari E, Sulistyani N. 2011. Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Batang Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen.) terhadap *Candida albicans* serta skrining fitokimia. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 1(2): 51-62, 59-60.
- Lenny S. 2006. *Senyawa flavonoid, fenilpropanoida dan alkaloid*. Medan : fakultas MIPA. Universitas Sumatra Utara.
- Lusia O. 2006. *Pemanfaatan Obat Tradisional Dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya*. *Majalah Kefarmasian*. Fakultas Farmasi Universitas Jember 1:1-7.
- Manoi, F. & Balittro. 2009. *Binahong (Anredera cordifolia) Sebagai Obat*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Mus. 2009. Informasi Spesies Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) steenis). www.plantamor.com/spcdetail.php?recid=1387. [18 juli 2016].
- Odianti G.T. 2010. *Uji Aktivitas Antibakteri Alfa Menostin Kulit Buah Manggis [Skripsi]*. Surakarta;Fakultas Farmasi, Unverstias Muhamaddiyah.
- Palezar, M. J., Chan E. C.S. Pelezar, M.F., Penerjemah: Hadjoetomo, R, S.Dkk 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Jilid I. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. Hlm 107-173.
- Radji M. 2011. *Mikrobiologi*. Buku Kedokteran ECG, Jakarta.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Ed ke-5 dan ke-6. Padmawinata K penerjemah; Bandung: ITB. Terjemahan dari: *The Organic Constituents Of Higher Plants*.
- Setiaji, Ari. 2009. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Petroleum, Etil Asetat Dan Etanol 70% Rhizoma Binahong Terhadap Staphylococcus aureus ATCC 25923 dan Escherichia Coli ATCC 11229 serta Skrining Fitokimianya*. hlm 24-30.

- Supardi, 1999. *Mikrobiologi dalam pengolahan dan keamanan pangan*. Penerbit Alumni Bandung, Halaman 137-139.
- Suriawiria, U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Papis Sinar Sinanti.
- Thomson RH. 2008. *The Chemistry Of Natural Product. 2 Edition. Chapman and hall ltd.glasgow, UK*. hlm 209-211.
- Tian F *et al.* 2009. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Consecutive Extracts from *Galla chinensis* The Polarity Effect The Bioactivities. *Food Chemistry* 113: 173-179.
- Tiwari, Kumar, Kaur Mandeep, Kaur Gurpreet & Kaur Harleem. 2011 *Phytochemical Screening and Extraction : A Review. Internationale Pharmaceutica Scientia vol. 1: issue 1*.
- Tshikalange, T.E., Meyer, J.J.M. and Hussein, A.A. 2005. *Antimicrobial Activity, Toxicity and the Isolation of Bioactive Compound from Plants Used to Treat Sexually Transmitted Disease. J. Ethnopharmacol.* 96: 515-519.
- Voigt R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, penerjemah; Soendani Noerono Soewandi. Ed ke-5 Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Hlm 561, 564.
- Volk WA, dan Wheeler MF. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Penerbit Erlangga. Jakarta, hal 97, 331-335.

L

A

M

P

I

R

A

N

Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman binahong



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

Nomor : 016/UN27.9.6.4/Lab/2017
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -

Nama Pemesan : Nisa Fitri Andhini
NIM : 19133910A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis
Familia : Basellaceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr.(1963) :
1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31b-403b-
404b-405b-414a-415b-451b-466b-467b-468b-469b-470e-541a _____ 49. Basellaceae
1b _____ 2. *Anredera*
1 _____ *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis

Deskripsi Tumbuhan :

Habitus : terna, menahun, merambat, tinggi 1-3 m. Akar : tunggang, bercabang, berdaging lunak, putih kotor atau putih kekuningan atau coklat muda. Batang : bentuk bulat, lunak berair, membelit, kulit batang berwarna merah, permukaan licin dan gundul, panjang bisa mencapai 20-30 m, diameter 3.5 cm. Umbi : muncul di ketiak daun, berbentuk bulat, permukaan kasar, kulit umbi berwarna hijau kecoklatan, daging umbi berwarna putih, panjang 5-7 cm, diameter 1-4 cm. Daun : tunggal, letak berseling, bentuk bulat telur atau jantung, panjang 1-11 cm, lebar 0.75-8 cm, pangkal berlekuk, tepi daun rata, ujung runcing atau tumpul, permukaan licin dan gundul, tulang daun menyirip, permukaan atas hijau tua, permukaan bawah hijau muda; tangkai daun bulat, licin dan gundul, panjang tangkai daun 1-3 cm. Bunga : majemuk tipe tandan yang, bercabang atau tidak di ketiak daun, terdiri atas banyak kuntum bunga, bunga kecil-kecil, berbau harum, berkelamin banci (biseksual) atau berkelamin satu (uniseksual), bagian-bagian bunga berbilangan 5; panjang tangkai bunga 1.5-2 mm; brakteola paling bawah bulat telur segitiga, kemerah-merahan; brakteola paling atas putih kehijauan, lebih pendek daripada perhiasan bunga; perhiasan bunga dalam bentuk tepala (tidak bisa dibedakan kelopak bunga dan mahkota bunga), berjumlah 5, bulat telur, diameter 5.5-8 mm, ujungnya tumpul, berlepasan, berwarna krem keputih-putihan; tangkai sari putih, tangkai putik putih.

Surakarta, 4 Januari 2017

Mengetahui,
Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS



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

Penanggungjawab
Determinasi Tumbuhan

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

**Lampiran 2. Tanaman dan serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia*
(Ten.) Steenis)**



Daun binahong



Serbuk daun binahong

Lampiran 3. Gambar daun binahong basah, oven, simplisia daun binahong, mesin penggiling, ayakan 40, botol gelap, penyaringan ekstrak dan *Rotary Evaporator*



Daun binahong basah



Oven



Simplisia daun binahong



Mesin penggiling



Ayakan 40



Botol gelap



Penyaringan ekstrak



Rotary Evaporator

Lampiran 4. Penetapan kadar lembab serbuk daun binahong dan uji bebas alkohol ekstrak binahong



Moisture balance



Uji bebas etanol ekstrak binahong

**Lampiran 5. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi daun
binahong**

Ekstrak

			
Flavonoid (+)	Alkaloid (+)	Saponin (+)	Terpenoid (+)

Fraksi *n*-heksana

			
Flavanoid (-)	Alkaloid (-)	Saponin (-)	Terpenoid (+)

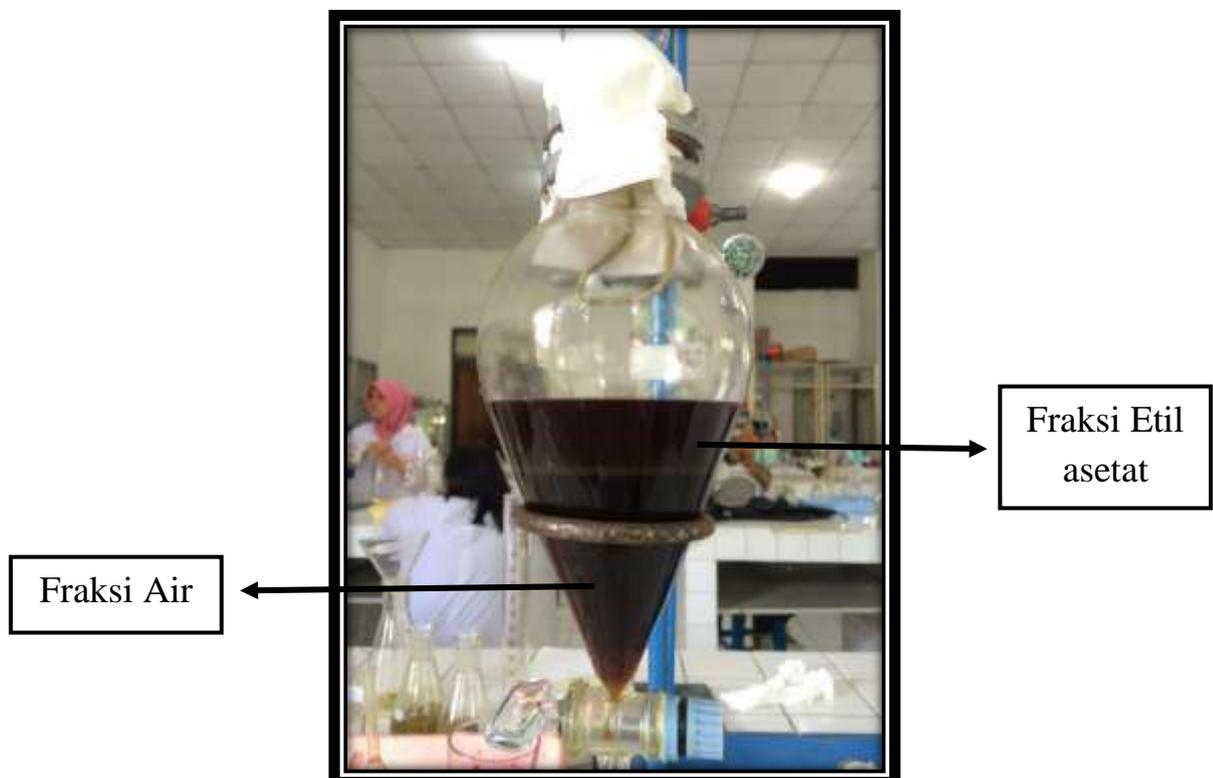
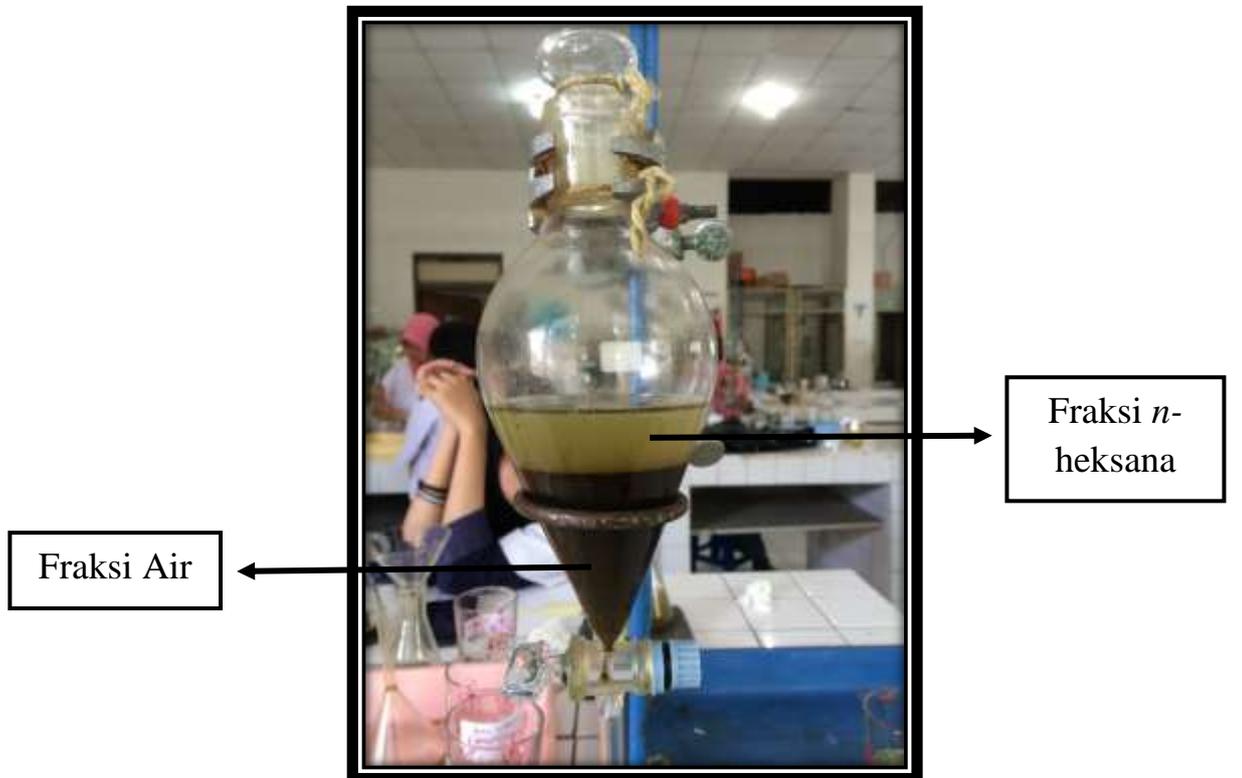
Fraksi etil asetat

			
Flavanoid (-)	Alkaloid (+)	Saponin (-)	Terpenoid (-)

Fraksi air

			
Flavonoid (+)	Alkaloid (+)	Saponin (+)	Terpenoid (-)

Lampiran 6. Fraksinasi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air



Lampiran 7. Ekstrak, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air



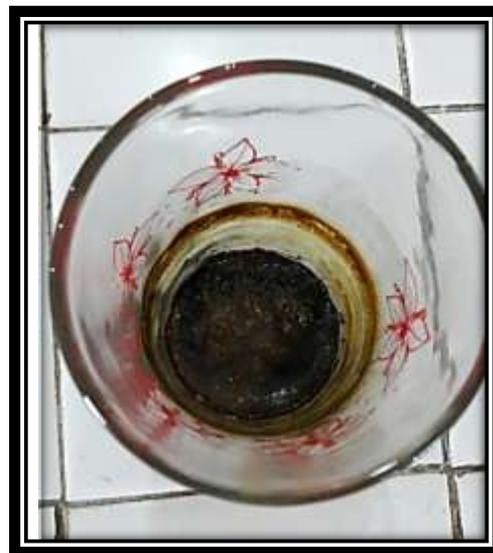
Ekstrak



Fraksi *n*-heksana



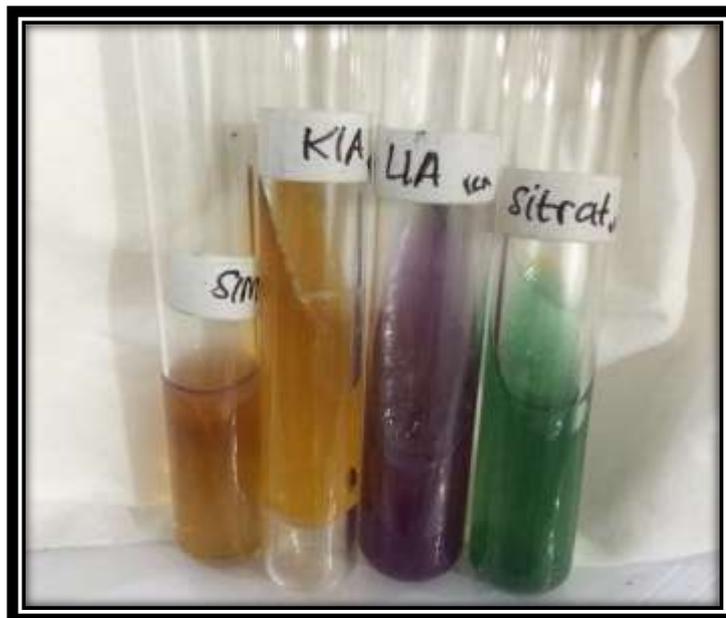
Fraksi etil asetat



Fraksi air

Lampiran 8. Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922Identifikasi makroskopis *Escherichia coli*

Identifikasi mikroskopis pewarnaan Gram



Uji biokimia pada KIA, LIA, SIM, Sitrat

Lampiran 9. Hasil perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun binahong

No.	Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Persentase (%)
1.	4000	950	23,75

$$\begin{aligned}\text{Perhitungan persentase bobot kering} &= \frac{\text{bobot kering (kg)}}{\text{bobot basah (kg)}} \times 100\% \\ &= \frac{950}{4000} \times 100 \% \\ &= 23,75 \%\end{aligned}$$

Lampiran 10. Rendemen ekstrak etanol daun binahong

Serbuk daun binahong (gram)	Ekstrak kental (gram)	Rendemen(%)
400	78,83	19,71

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

$$= \frac{78,83}{400} \times 100\%$$

$$= 19,71\%$$

Lampiran 11. Hasil perhitungan rendemen fraksinasi

Rendemen hasil fraksinasi			
Nama pelarut	Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Persen rendemen (%)
<i>n</i> -heksana	10,00	1,93	19,3
	10,00	1,98	19,8
	10,00	1,96	19,6
	Rata-rata	1,96	19,56
Etil asetat	10,00	2,64	26,4
	10,00	2,57	25,7
	10,00	2,73	27,3
	Rata-rata	2,65	26,46
Air	10,00	7,03	70,3
	10,00	6,98	69,8
	10,00	7,09	70,9
	Rata-rata	7,03	70,3

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

1. Fraksi *n*-heksana

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen 1} &= \frac{1,93}{10} \times 100\% \\ &= 19,3 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen 2} &= \frac{1,98}{10} \times 100\% \\ &= 19,8 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen 3} &= \frac{1,96}{10} \times 100\% \\ &= 19,6 \% \end{aligned}$$

Persentase rata-rata rendemen fraksi *n*-heksana yaitu 19,56 %.

2. Fraksi etil asetat

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen 1} &= \frac{2,64}{10} \times 100\% \\ &= 26,4 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen 2} &= \frac{2,57}{10} \times 100\% \\ &= 25,7 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen 3} &= \frac{2,73}{10} \times 100\% \\ &= 27,3 \% \end{aligned}$$

Persentase rata-rata rendemen fraksi etil asetat yaitu 26,46 %.

3. Fraksi air

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen 1} &= \frac{7,03}{10} \times 100\% \\ &= 70,3 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen 2} &= \frac{6,98}{10} \times 100\% \\ &= 69,8 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen 3} &= \frac{7,09}{10} \times 100\% \\ &= 70,9 \%\end{aligned}$$

Persentase rata-rata rendemen fraksi air yaitu 70,3 %.

Lampiran 12. Perhitungan pembuatan konsentrasi ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air metode difusi

1. Konsentrasi 50 %

Ditimbang masing-masing 1 gram ekstrak , fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air, kemudian masing-masing dilarutkan dengan DMSO 1 % sampai 2 mL.

Keterangan : V_1 = volume awal

V_2 = volume setelah pengenceran

C_1 = konsentrasi awal

C_2 = konsentrasi setelah pengenceran

2. Konsentrasi 25%

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

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

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

$$V = 0,5 \text{ mL}$$

Dipipet 0,5 mL dari sediaan awal (50%) kemudian ditambah DMSO 1% sampai 1 mL menggunakan labu takar.

3. Konsentrasi 12,5%

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

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

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

$$V = 0,5 \text{ mL}$$

Dipipet 0,5 mL dari sediaan awal (25%) kemudian ditambah DMSO 1% sampai 1 mL menggunakan labu takar.

Lampiran 13. Pembuatan larutan stok dilusi

Larutan stok 50% = %^{b/v} = 5 gram/10 ml DMSO 1%

Konsentrasi 50% = 0,5 gram/ ml

$$\text{Konsentrasi 25\%} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{50\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 50\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 25\%$$

$$\text{Konsentrasi 12,5\%} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{25\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 25\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 12,5\%$$

$$\text{Konsentrasi 6,25\%} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{12,5\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 12,5\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 6,25\%$$

$$\text{Konsentrasi 3,125\%} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{6,25\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 6,25\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 3,125\%$$

$$\text{Konsentrasi 1,56\%} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{3,125\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 3,125\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 1,56\%$$

$$\text{Konsentrasi 0,78\%} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{1,56\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 1,56\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,78\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,39\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{0,78\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,78\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,39\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,19\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{0,39\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,39\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,19\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,09\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{0,19\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,19\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,09\%$$

Kontrol negatif (-) berisi 1 ml fraksi air

Kontrol positif (+) berisi 1 ml suspensi bakteri

Lampiran 14. Penghitungan konsentrasi pembanding kotrimoksazol secara difusi dan dilusi

Perhitungan konsentrasi kotrimoksazol pada uji difusi adalah sebagai berikut:

Kotrimoksazol terdiri dari kombinasi sulfametoksazol 200 mg dan 40 mg trimethoprim per 5 mL sediaan suspensi, dengan menggunakan pipet droper 10 μ l.

Hitungan persen (%):

$$\text{Sulfametoksazol 200 mg} \longrightarrow \frac{200 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} = 40 \text{ mg/mL}$$

$$= 0,04 \text{ g/mL}$$

$$= 4 \text{ \%b/v}$$

$$\text{Trimethoprim 40 mg} \longrightarrow \frac{40 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} = 8 \text{ mg/mL}$$

$$= 0,008 \text{ g/mL}$$

$$= 0,8 \text{ \%b/v}$$

Jadi, dalam 5 mL suspensi kotrimoksazol terdapat kombinasi Sulfametoksazol dan Trimethoprim sebesar 4 %b/v dan 0,8 %b/v.

Perhitungan seri konsentrasi kotrimoksazol pada uji dilusi adalah sebagai berikut:

Kotrimoksazol terdiri dari kombinasi Sulfametoksazol 200 mg atau 4 %b/v dan Trimethoprim 40 mg atau 0,8 %b/v dalam tiap 5 mL sediaan suspensi.

$$\text{Dosis kotrimoksazol} = 240 \text{ mg/5 mL}$$

$$= 4800 \text{ mg/100 mL}$$

$$= 4,8 \text{ gram/100 ml}$$

$$= 4,8 \text{ \%b/v}$$

$$\text{Konsentrasi 1} = 4,8\%$$

$$\text{Konsentrasi 2} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{4,8\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 4,8\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 2,4 \%$$

$$\text{Konsentrasi 3} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{2,4\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 2,4\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 1,2 \%$$

$$\text{Konsentrasi 4} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{1,2\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 1,2\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,6 \%$$

$$\text{Konsentrasi 5} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{0,6\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,6\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,3 \%$$

$$\text{Konsentrasi 6} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{0,3\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,3\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,15 \%$$

$$\text{Konsentrasi 7} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{0,15\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,15\% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,075\%$$

$$\text{Konsentrasi 8} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{0,075\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,075 \% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,0375 \%$$

$$\text{Konsentrasi 9} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_{0,5} \cdot C_{0,0375\%} = V_{1\text{mL}} \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,0375 \% = 1 \text{ mL} \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,01875 \%$$

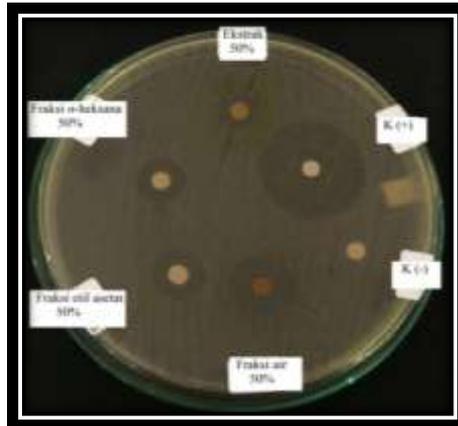
$$\text{Konsentrasi 10} = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$\begin{aligned}V_{0,5} \cdot C_{0,01875\%} &= V_{1\text{mL}} \cdot C_2 \\0,5 \cdot 0,01875\% &= 1 \text{ mL} \cdot C_2 \\C_2 &= 0,009375\%\end{aligned}$$

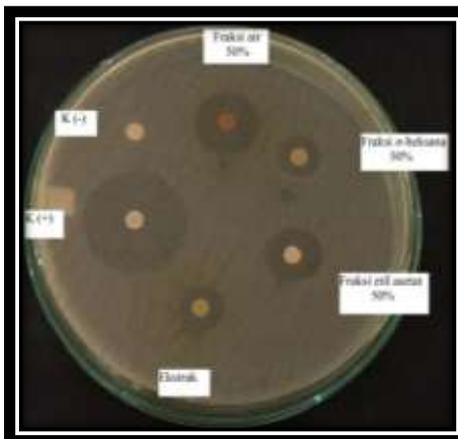
Lampiran 15. Hasil uji aktivitas antibakteri metode difusi

Uji difusi konsentrasi 50%

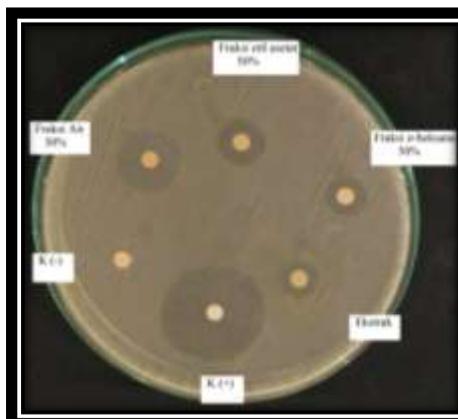
Replikasi 1



Replikasi 2

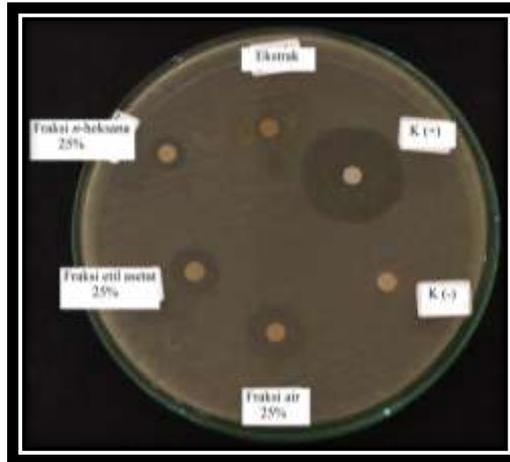


Replikasi 3

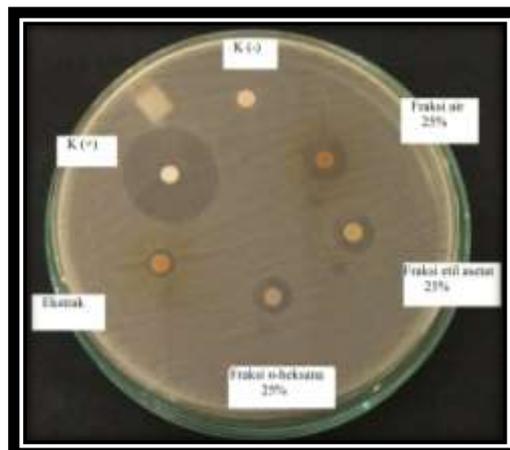


Uji difusi konsentrasi 25%

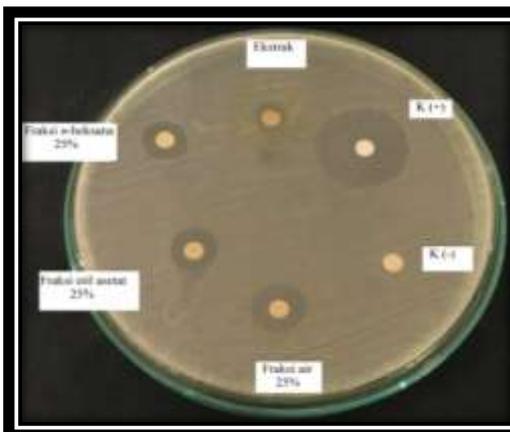
Replikasi 1



Replikasi 2

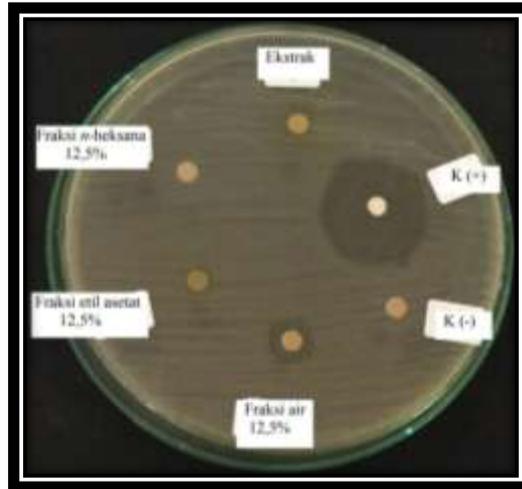


Replikasi 3

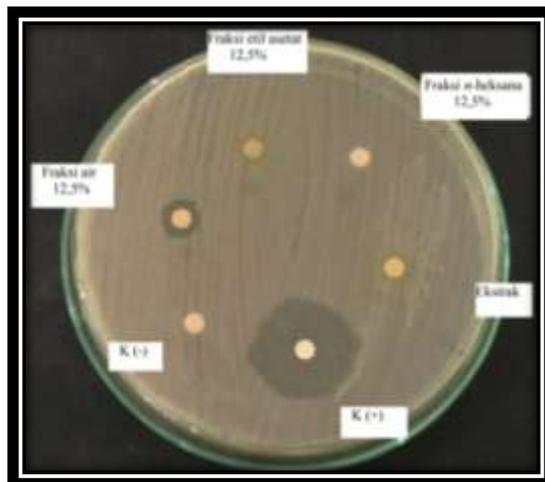


Uji difusi konsentrasi 12,5%

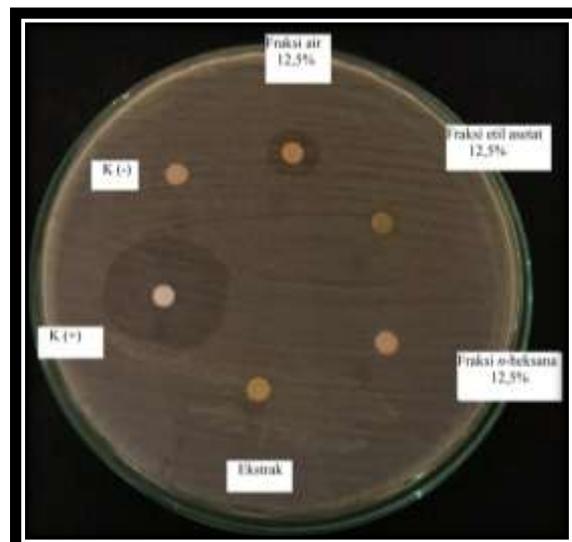
Replikasi 1



Replikasi 2

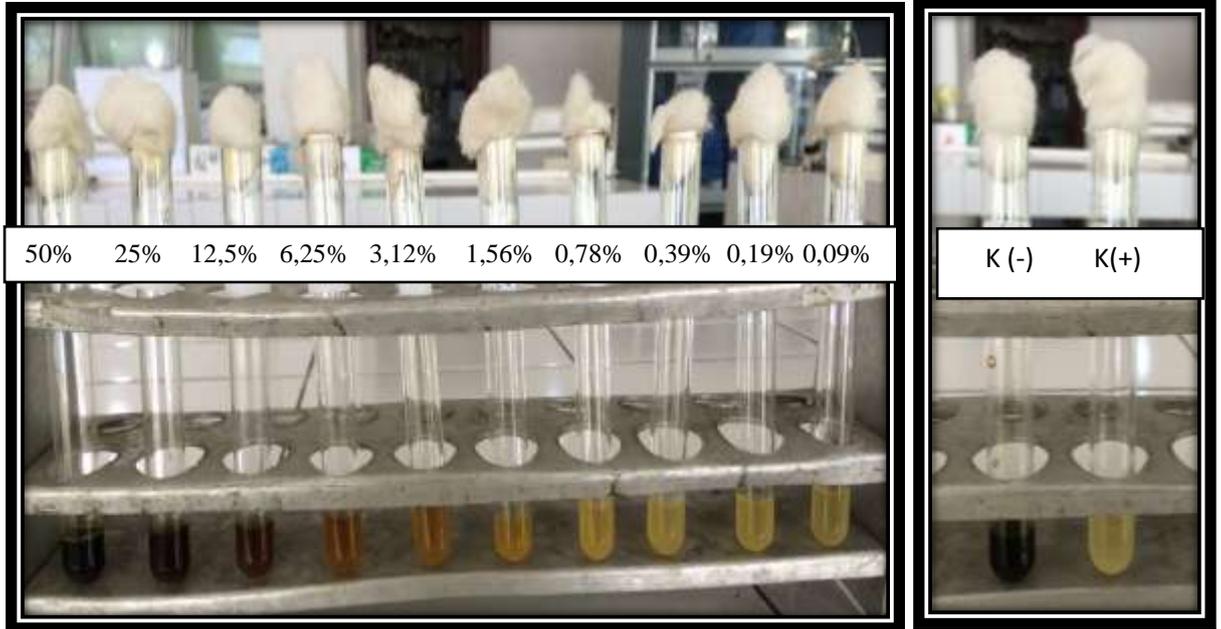


Replikasi 3

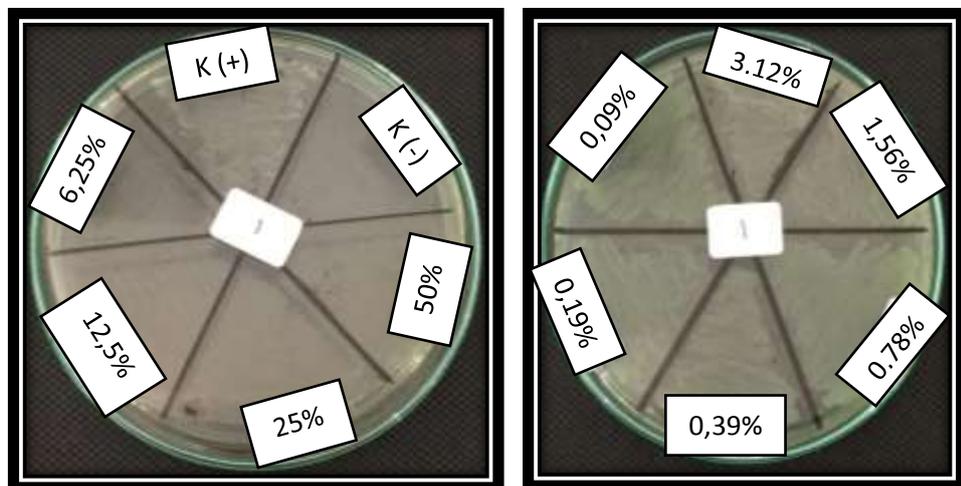


Lampiran 16. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air metode dilusi

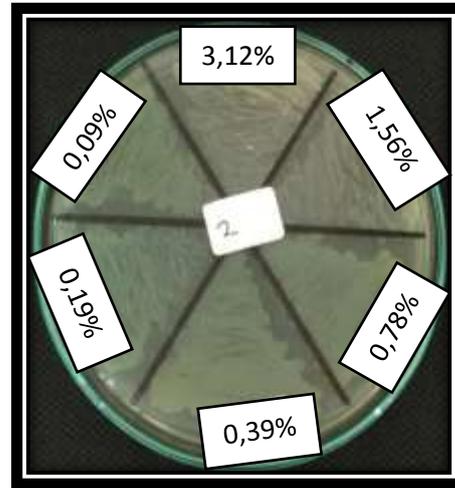
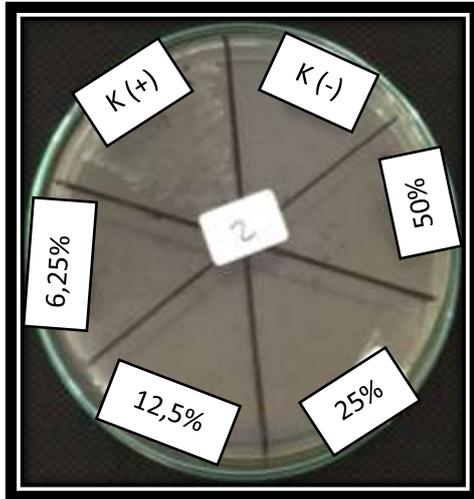
Uji dilusi fraksi air



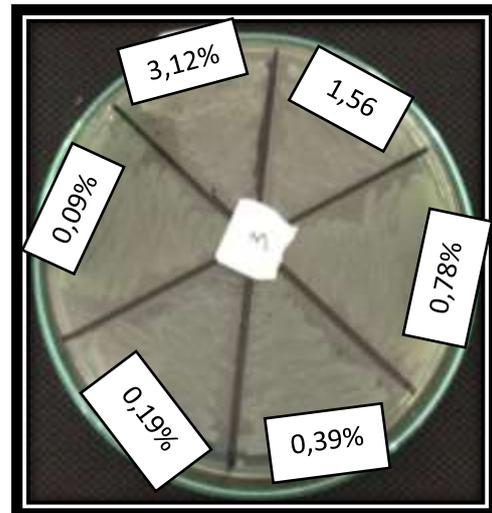
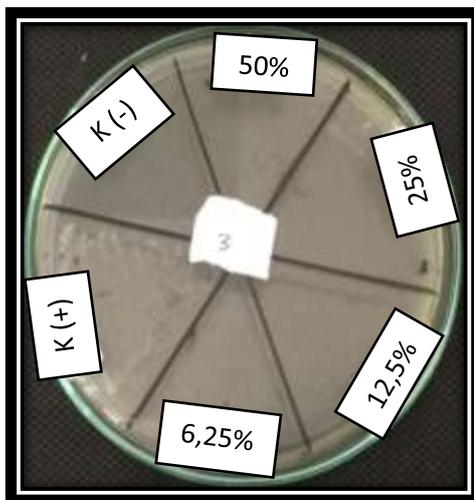
Replikasi 1



Replikasi 2

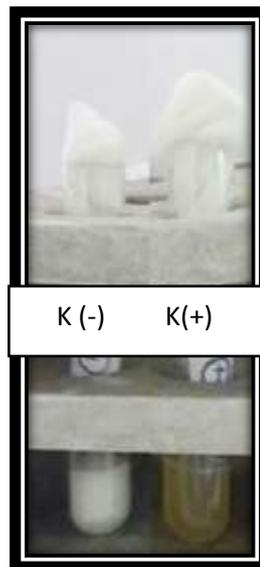
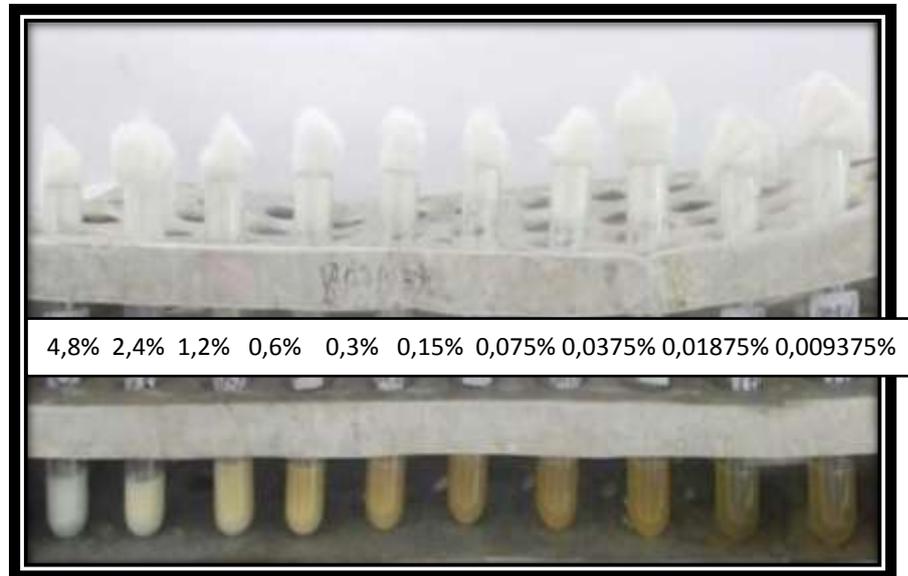


Replikasi 3

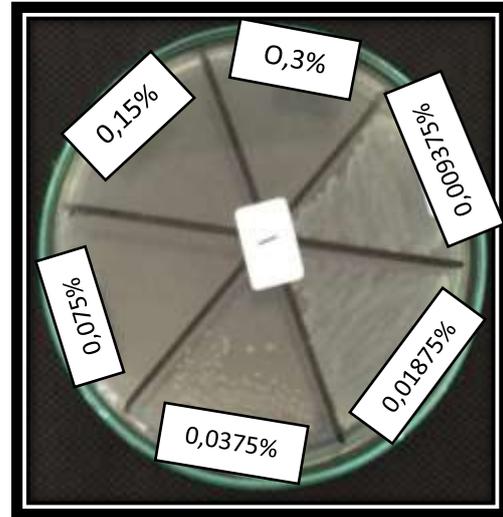
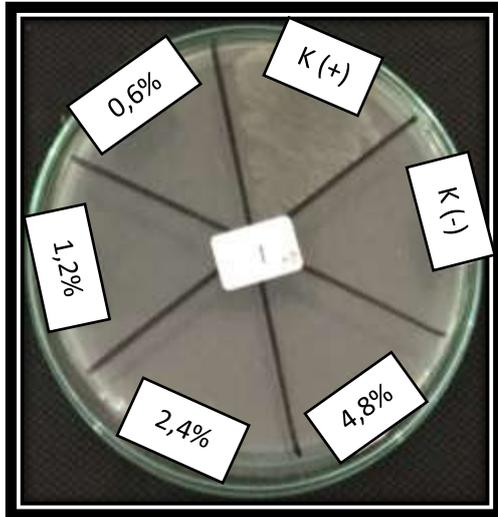


Lampiran 17. Hasil uji aktivitas antibakteri kotrimoksazol metode dilusi

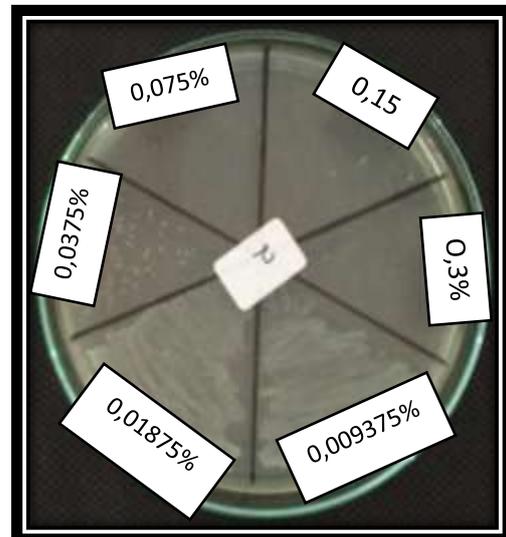
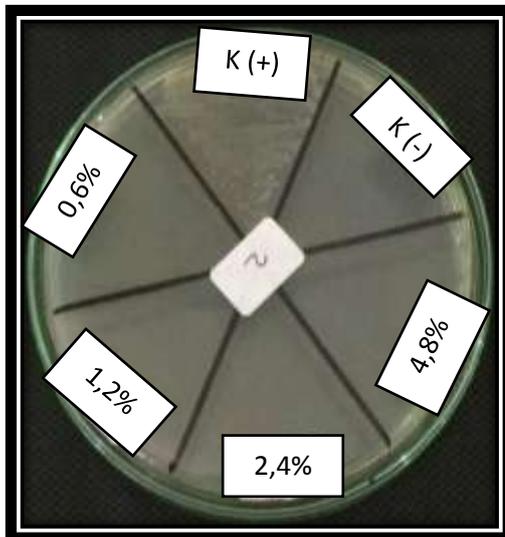
Uji dilusi kotrimoksazol



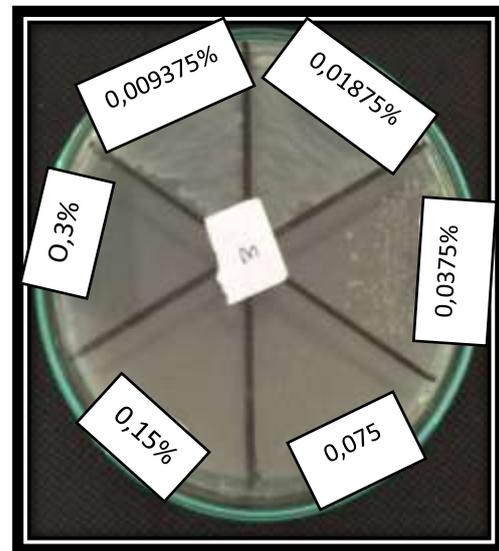
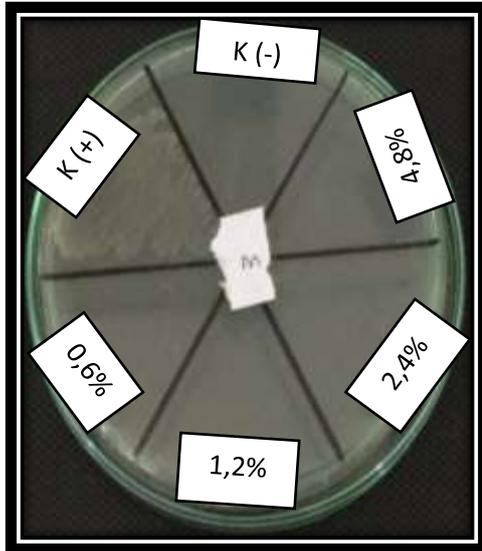
Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3



Lampiran 18. Alat yang digunakan untuk praktikum**Inkas****Inkubator****Kompor****autoclav**



Jarum ose dan Ent



lampu spiritus

Lampiran 19. Formulasi dan pembuatan media

1. Formulasi dan pembuatan Endo Agar (EA)

Pepton from meat	10,0 g
Di potassium hidrogen fosfat	3,5 g
Laktosa	10,0 g
Sodium sulfid	2,5 g
Fuchsin	0,4 g
Agar-Agar	12,5 g
pH 7,4	

Cara : Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.

2. Formulasi dan pembuatan Brain Heart Infusion (BHI)

Sari otak anak sapi	12 g
Sari jantung sapi	5 g
Protease pepton	10 g
Dextrose	2 g
NaCl	5 g
Dinatrium fosfat	2,5 g
Bacto agar	15 g
Aquadest	ad 1 L
pH 7,4	

Cara : Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquades sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung reaksi pH 7,4.

3. Komposisi media LIA (*Lysine Iron Agar*)

Pepton from meat	4,5 g
Yeast extract	3,0 g

Glukose	1,0 g
Lysine monohydrochloride	10,0 g
Sodium thiosulfate	0,04 g
Amonium iron (III) citrate	0,5 g
Bromo cresol purple	0,02 g
Agar-agar	12,5 g

pH 7,4

Cara : Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung reaksi pH 7,4.

4. Komposisi media KIA (*Kliger's Iron Agar*)

Pepton from casein	15,0 g
Pepton from meat	5,0 g
Meat extract	3,0 g
Sodium chloride	3,0 g
Laktose	10,0 g
Glukose	1,0 g
Amonium Iron (III) citrate	0,5 g
Sodium thiosulfate	0,5 g
Phenol red	0,024 g
Agar-agar	3,0 g

pH 7,4

Cara : Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung reaksi pH 7,4.

5. Komposisi media sitrat

Amonium hidrogen fosfat	1,0 g
Dipotassium hidrogen fosfat	1,0 g

Sodium chloride	5,0 g
Sodium citrate	2,0 g
Magnesium sulfate	0,2 g
Bromo thymol blue	0,08 g
Agar-agar	12,5 g
pH 7,4	

Cara : Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung reaksi pH 7,4.

6. Komposisi media SIM (*Sulfide Indol Motility*)

Pepton from casein	20,0 g
Pepton from meat	6,6 g
Amonium iron (III) citrate	0,2 g
Sodium thiosulfate	0,2 g
Agar-agar	3,0 g
pH 7,4	

Cara : Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam tabung reaksi pH 7,4.

7. Formulasi dan pembuatan Muller Hinton Agar (MHA)

Meat infusion	2.0 gram
Bacto asam kasamino	17,5 gram
Kanji	1,5 gram
Agar	17,0 gram

Cara : Reagen-reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.

Lampiran 20. Hasil analisis data uji ANOVA antara fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air, ekstrak etanol dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, kontrol (+), dan kontrol (-).

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
diameter	42	10.857	8.6240	.0	31.9

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		diameter
N		42
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	10.857
	Std. Deviation	8.6240
Most Extreme Differences	Absolute	.182
	Positive	.182
	Negative	-.135
Kolmogorov-Smirnov Z		1.177
Asymp. Sig. (2-tailed)		.125

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Diameter

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.546	13	28	.019

ANOVA

Diameter

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3046.823	13	234.371	2624.955	.000
Within Groups	2.500	28	.089		
Total	3049.323	41			

Descriptives

Diameter	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					n-heksana 50%	3		
etil asetat 50%	3	13.867	.3215	.1856	13.068	14.665	13.5	14.1
air 50%	3	19.100	.3606	.2082	18.204	19.996	18.8	19.5
ekstrak 50%	3	12.267	.2517	.1453	11.642	12.892	12.0	12.5
n-heksana 25%	3	11.133	.6028	.3480	9.636	12.631	10.5	11.7
etil asetat 25%	3	12.867	.2309	.1333	12.293	13.440	12.6	13.0
air 25%	3	15.833	.2517	.1453	15.208	16.458	15.6	16.1
ekstrak 25%	3	9.433	.4041	.2333	8.429	10.437	9.0	9.8
n-heksana 12,5%	3	.000	.0000	.0000	.000	.000	.0	.0
etil asetat 12,5%	3	.000	.0000	.0000	.000	.000	.0	.0
air 12,5%	3	13.267	.2082	.1202	12.750	13.784	13.1	13.5
ekstrak 12,5%	3	.000	.0000	.0000	.000	.000	.0	.0
kontrol +	3	31.467	.4509	.2603	30.347	32.587	31.0	31.9
kontrol -	3	.000	.0000	.0000	.000	.000	.0	.0
Total	42	10.857	8.6240	1.3307	8.170	13.545	.0	31.9

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

		Dependent Variable:diameter		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) sampel	(J) sampel		Lower Bound				Upper Bound	
Tukey HSD	n-heksana 50%							etil asetat 50%
		air 50%	-6.3333	.2440	.000	-7.226	-5.440	
		ekstrak 50%	.5000	.2440	.726	-.393	1.393	
		n-heksana 25%	1.6333	.2440	.000	.740	2.526	
		etil asetat 25%	-.1000	.2440	1.000	-.993	.793	
		air 25%	-3.0667	.2440	.000	-3.960	-2.174	
		ekstrak 25%	3.3333	.2440	.000	2.440	4.226	
		n-heksana 12,5%	12.7667	.2440	.000	11.874	13.660	
		etil asetat 12,5%	12.7667	.2440	.000	11.874	13.660	
		air 12,5%	-.5000	.2440	.726	-1.393	.393	
		ekstrak 12,5%	12.7667	.2440	.000	11.874	13.660	
		kontrol +	-18.7000	.2440	.000	-19.593	-17.807	
		kontrol -	12.7667	.2440	.000	11.874	13.660	
	etil asetat 50%	n-heksana 50%	1.1000	.2440	.006	.207	1.993	
		air 50%	-5.2333	.2440	.000	-6.126	-4.340	
		ekstrak 50%	1.6000	.2440	.000	.707	2.493	
		n-heksana 25%	2.7333	.2440	.000	1.840	3.626	
		etil asetat 25%	1.0000	.2440	.018	.107	1.893	
		air 25%	-1.9667	.2440	.000	-2.860	-1.074	
		ekstrak 25%	4.4333	.2440	.000	3.540	5.326	
		n-heksana 12,5%	13.8667	.2440	.000	12.974	14.760	
		etil asetat 12,5%	13.8667	.2440	.000	12.974	14.760	
		air 12,5%	.6000	.2440	.467	-.293	1.493	
		ekstrak 12,5%	13.8667	.2440	.000	12.974	14.760	
		kontrol +	-17.6000	.2440	.000	-18.493	-16.707	

	kontrol -	13.8667	.2440	.000	12.974	14.760
air 50%	n-heksana 50%	6.3333	.2440	.000	5.440	7.226
	etil asetat 50%	5.2333	.2440	.000	4.340	6.126
	ekstrak 50%	6.8333	.2440	.000	5.940	7.726
	n-heksana 25%	7.9667	.2440	.000	7.074	8.860
	etil asetat 25%	6.2333	.2440	.000	5.340	7.126
	air 25%	3.2667	.2440	.000	2.374	4.160
	ekstrak 25%	9.6667	.2440	.000	8.774	10.560
	n-heksana 12,5%	19.1000	.2440	.000	18.207	19.993
	etil asetat 12,5%	19.1000	.2440	.000	18.207	19.993
	air 12,5%	5.8333	.2440	.000	4.940	6.726
	ekstrak 12,5%	19.1000	.2440	.000	18.207	19.993
	kontrol +	-12.3667	.2440	.000	-13.260	-11.474
	kontrol -	19.1000	.2440	.000	18.207	19.993
ekstrak 50%	n-heksana 50%	-5.000	.2440	.726	-1.393	.393
	etil asetat 50%	-1.6000	.2440	.000	-2.493	-.707
	air 50%	-6.8333	.2440	.000	-7.726	-5.940
	n-heksana 25%	1.1333	.2440	.005	.240	2.026
	etil asetat 25%	-.6000	.2440	.467	-1.493	.293
	air 25%	-3.5667	.2440	.000	-4.460	-2.674
	ekstrak 25%	2.8333	.2440	.000	1.940	3.726
	n-heksana 12,5%	12.2667	.2440	.000	11.374	13.160
	etil asetat 12,5%	12.2667	.2440	.000	11.374	13.160
	air 12,5%	-1.0000	.2440	.018	-1.893	-.107
	ekstrak 12,5%	12.2667	.2440	.000	11.374	13.160
	kontrol +	-19.2000	.2440	.000	-20.093	-18.307
	kontrol -	12.2667	.2440	.000	11.374	13.160
n-heksana 25%	n-heksana 50%	-1.6333	.2440	.000	-2.526	-.740
	etil asetat 50%	-2.7333	.2440	.000	-3.626	-1.840
	air 50%	-7.9667	.2440	.000	-8.860	-7.074
	ekstrak 50%	-1.1333	.2440	.005	-2.026	-.240
	etil asetat 25%	-1.7333	.2440	.000	-2.626	-.840
	air 25%	-4.7000	.2440	.000	-5.593	-3.807
	ekstrak 25%	1.7000	.2440	.000	.807	2.593
	n-heksana 12,5%	11.1333	.2440	.000	10.240	12.026
	etil asetat 12,5%	11.1333	.2440	.000	10.240	12.026
	air 12,5%	-2.1333	.2440	.000	-3.026	-1.240
	ekstrak 12,5%	11.1333	.2440	.000	10.240	12.026
	kontrol +	-20.3333	.2440	.000	-21.226	-19.440
	kontrol -	11.1333	.2440	.000	10.240	12.026
etil asetat 25%	n-heksana 50%	.1000	.2440	1.000	-.793	.993
	etil asetat 50%	-1.0000	.2440	.018	-1.893	-.107
	air 50%	-6.2333	.2440	.000	-7.126	-5.340
	ekstrak 50%	.6000	.2440	.467	-.293	1.493
	n-heksana 25%	1.7333	.2440	.000	.840	2.626
	air 25%	-2.9667	.2440	.000	-3.860	-2.074
	ekstrak 25%	3.4333	.2440	.000	2.540	4.326
	n-heksana 12,5%	12.8667	.2440	.000	11.974	13.760
	etil asetat 12,5%	12.8667	.2440	.000	11.974	13.760
	air 12,5%	-.4000	.2440	.920	-1.293	.493
	ekstrak 12,5%	12.8667	.2440	.000	11.974	13.760
	kontrol +	-18.6000	.2440	.000	-19.493	-17.707

	kontrol -	12.8667	.2440	.000	11.974	13.760
air 25%	n-heksana 50%	3.0667	.2440	.000	2.174	3.960
	etil asetat 50%	1.9667	.2440	.000	1.074	2.860
	air 50%	-3.2667	.2440	.000	-4.160	-2.374
	ekstrak 50%	3.5667	.2440	.000	2.674	4.460
	n-heksana 25%	4.7000	.2440	.000	3.807	5.593
	etil asetat 25%	2.9667	.2440	.000	2.074	3.860
	ekstrak 25%	6.4000	.2440	.000	5.507	7.293
	n-heksana 12,5%	15.8333	.2440	.000	14.940	16.726
	etil asetat 12,5%	15.8333	.2440	.000	14.940	16.726
	air 12,5%	2.5667	.2440	.000	1.674	3.460
	ekstrak 12,5%	15.8333	.2440	.000	14.940	16.726
	kontrol +	-15.6333	.2440	.000	-16.526	-14.740
	kontrol -	15.8333	.2440	.000	14.940	16.726
ekstrak 25%	n-heksana 50%	-3.3333	.2440	.000	-4.226	-2.440
	etil asetat 50%	-4.4333	.2440	.000	-5.326	-3.540
	air 50%	-9.6667	.2440	.000	-10.560	-8.774
	ekstrak 50%	-2.8333	.2440	.000	-3.726	-1.940
	n-heksana 25%	-1.7000	.2440	.000	-2.593	-.807
	etil asetat 25%	-3.4333	.2440	.000	-4.326	-2.540
	air 25%	-6.4000	.2440	.000	-7.293	-5.507
	n-heksana 12,5%	9.4333	.2440	.000	8.540	10.326
	etil asetat 12,5%	9.4333	.2440	.000	8.540	10.326
	air 12,5%	-3.8333	.2440	.000	-4.726	-2.940
	ekstrak 12,5%	9.4333	.2440	.000	8.540	10.326
	kontrol +	-22.0333	.2440	.000	-22.926	-21.140
	kontrol -	9.4333	.2440	.000	8.540	10.326
n-heksana 12,5%	n-heksana 50%	-12.7667	.2440	.000	-13.660	-11.874
	etil asetat 50%	-13.8667	.2440	.000	-14.760	-12.974
	air 50%	-19.1000	.2440	.000	-19.993	-18.207
	ekstrak 50%	-12.2667	.2440	.000	-13.160	-11.374
	n-heksana 25%	-11.1333	.2440	.000	-12.026	-10.240
	etil asetat 25%	-12.8667	.2440	.000	-13.760	-11.974
	air 25%	-15.8333	.2440	.000	-16.726	-14.940
	ekstrak 25%	-9.4333	.2440	.000	-10.326	-8.540
	etil asetat 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.893	.893
	air 12,5%	-13.2667	.2440	.000	-14.160	-12.374
	ekstrak 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.893	.893
	kontrol +	-31.4667	.2440	.000	-32.360	-30.574
	kontrol -	.0000	.2440	1.000	-.893	.893
etil asetat 12,5%	n-heksana 50%	-12.7667	.2440	.000	-13.660	-11.874
	etil asetat 50%	-13.8667	.2440	.000	-14.760	-12.974
	air 50%	-19.1000	.2440	.000	-19.993	-18.207
	ekstrak 50%	-12.2667	.2440	.000	-13.160	-11.374
	n-heksana 25%	-11.1333	.2440	.000	-12.026	-10.240
	etil asetat 25%	-12.8667	.2440	.000	-13.760	-11.974
	air 25%	-15.8333	.2440	.000	-16.726	-14.940
	ekstrak 25%	-9.4333	.2440	.000	-10.326	-8.540
	n-heksana 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.893	.893
	air 12,5%	-13.2667	.2440	.000	-14.160	-12.374
	ekstrak 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.893	.893
	kontrol +	-31.4667	.2440	.000	-32.360	-30.574

	kontrol -	.0000	.2440	1.000	- .893	.893
air 12,5%	n-heksana 50%	.5000	.2440	.726	- .393	1.393
	etil asetat 50%	- .6000	.2440	.467	-1.493	.293
	air 50%	-5.8333	.2440	.000	-6.726	-4.940
	ekstrak 50%	1.0000	.2440	.018	.107	1.893
	n-heksana 25%	2.1333	.2440	.000	1.240	3.026
	etil asetat 25%	.4000	.2440	.920	- .493	1.293
	air 25%	-2.5667	.2440	.000	-3.460	-1.674
	ekstrak 25%	3.8333	.2440	.000	2.940	4.726
	n-heksana 12,5%	13.2667	.2440	.000	12.374	14.160
	etil asetat 12,5%	13.2667	.2440	.000	12.374	14.160
	ekstrak 12,5%	13.2667	.2440	.000	12.374	14.160
	kontrol +	-18.2000	.2440	.000	-19.093	-17.307
	kontrol -	13.2667	.2440	.000	12.374	14.160
ekstrak 12,5%	n-heksana 50%	-12.7667	.2440	.000	-13.660	-11.874
	etil asetat 50%	-13.8667	.2440	.000	-14.760	-12.974
	air 50%	-19.1000	.2440	.000	-19.993	-18.207
	ekstrak 50%	-12.2667	.2440	.000	-13.160	-11.374
	n-heksana 25%	-11.1333	.2440	.000	-12.026	-10.240
	etil asetat 25%	-12.8667	.2440	.000	-13.760	-11.974
	air 25%	-15.8333	.2440	.000	-16.726	-14.940
	ekstrak 25%	-9.4333	.2440	.000	-10.326	-8.540
	n-heksana 12,5%	.0000	.2440	1.000	- .893	.893
	etil asetat 12,5%	.0000	.2440	1.000	- .893	.893
	air 12,5%	-13.2667	.2440	.000	-14.160	-12.374
	kontrol +	-31.4667	.2440	.000	-32.360	-30.574
	kontrol -	.0000	.2440	1.000	- .893	.893
kontrol +	n-heksana 50%	18.7000	.2440	.000	17.807	19.593
	etil asetat 50%	17.6000	.2440	.000	16.707	18.493
	air 50%	12.3667	.2440	.000	11.474	13.260
	ekstrak 50%	19.2000	.2440	.000	18.307	20.093
	n-heksana 25%	20.3333	.2440	.000	19.440	21.226
	etil asetat 25%	18.6000	.2440	.000	17.707	19.493
	air 25%	15.6333	.2440	.000	14.740	16.526
	ekstrak 25%	22.0333	.2440	.000	21.140	22.926
	n-heksana 12,5%	31.4667	.2440	.000	30.574	32.360
	etil asetat 12,5%	31.4667	.2440	.000	30.574	32.360
	air 12,5%	18.2000	.2440	.000	17.307	19.093
	ekstrak 12,5%	31.4667	.2440	.000	30.574	32.360
	kontrol -	31.4667	.2440	.000	30.574	32.360
kontrol -	n-heksana 50%	-12.7667	.2440	.000	-13.660	-11.874
	etil asetat 50%	-13.8667	.2440	.000	-14.760	-12.974
	air 50%	-19.1000	.2440	.000	-19.993	-18.207
	ekstrak 50%	-12.2667	.2440	.000	-13.160	-11.374
	n-heksana 25%	-11.1333	.2440	.000	-12.026	-10.240
	etil asetat 25%	-12.8667	.2440	.000	-13.760	-11.974
	air 25%	-15.8333	.2440	.000	-16.726	-14.940
	ekstrak 25%	-9.4333	.2440	.000	-10.326	-8.540
	n-heksana 12,5%	.0000	.2440	1.000	- .893	.893
	etil asetat 12,5%	.0000	.2440	1.000	- .893	.893
	air 12,5%	-13.2667	.2440	.000	-14.160	-12.374
	ekstrak 12,5%	.0000	.2440	1.000	- .893	.893

		kontrol +	-31.4667	.2440	.000	-32.360	-30.574
Bonfer roni	n-heksana 50%	etil asetat 50%	-1.1000	.2440	.010	-2.051	-.149
		air 50%	-6.3333	.2440	.000	-7.285	-5.382
		ekstrak 50%	.5000	.2440	1.000	-.451	1.451
		n-heksana 25%	1.6333	.2440	.000	.682	2.585
		etil asetat 25%	-.1000	.2440	1.000	-1.051	.851
		air 25%	-3.0667	.2440	.000	-4.018	-2.115
		ekstrak 25%	3.3333	.2440	.000	2.382	4.285
		n-heksana 12,5%	12.7667	.2440	.000	11.815	13.718
		etil asetat 12,5%	12.7667	.2440	.000	11.815	13.718
		air 12,5%	-.5000	.2440	1.000	-1.451	.451
		ekstrak 12,5%	12.7667	.2440	.000	11.815	13.718
		kontrol +	-18.7000	.2440	.000	-19.651	-17.749
		kontrol -	12.7667	.2440	.000	11.815	13.718
	etil asetat 50%	n-heksana 50%	1.1000	.2440	.010	.149	2.051
		air 50%	-5.2333	.2440	.000	-6.185	-4.282
		ekstrak 50%	1.6000	.2440	.000	.649	2.551
		n-heksana 25%	2.7333	.2440	.000	1.782	3.685
		etil asetat 25%	1.0000	.2440	.029	.049	1.951
		air 25%	-1.9667	.2440	.000	-2.918	-1.015
		ekstrak 25%	4.4333	.2440	.000	3.482	5.385
		n-heksana 12,5%	13.8667	.2440	.000	12.915	14.818
		etil asetat 12,5%	13.8667	.2440	.000	12.915	14.818
		air 12,5%	.6000	.2440	1.000	-.351	1.551
		ekstrak 12,5%	13.8667	.2440	.000	12.915	14.818
		kontrol +	-17.6000	.2440	.000	-18.551	-16.649
		kontrol -	13.8667	.2440	.000	12.915	14.818
	air 50%	n-heksana 50%	6.3333	.2440	.000	5.382	7.285
		etil asetat 50%	5.2333	.2440	.000	4.282	6.185
		ekstrak 50%	6.8333	.2440	.000	5.882	7.785
		n-heksana 25%	7.9667	.2440	.000	7.015	8.918
		etil asetat 25%	6.2333	.2440	.000	5.282	7.185
		air 25%	3.2667	.2440	.000	2.315	4.218
		ekstrak 25%	9.6667	.2440	.000	8.715	10.618
		n-heksana 12,5%	19.1000	.2440	.000	18.149	20.051
		etil asetat 12,5%	19.1000	.2440	.000	18.149	20.051
		air 12,5%	5.8333	.2440	.000	4.882	6.785
		ekstrak 12,5%	19.1000	.2440	.000	18.149	20.051
		kontrol +	-12.3667	.2440	.000	-13.318	-11.415
		kontrol -	19.1000	.2440	.000	18.149	20.051
	ekstrak 50%	n-heksana 50%	-.5000	.2440	1.000	-1.451	.451
		etil asetat 50%	-1.6000	.2440	.000	-2.551	-.649
		air 50%	-6.8333	.2440	.000	-7.785	-5.882
		n-heksana 25%	1.1333	.2440	.007	.182	2.085
		etil asetat 25%	-.6000	.2440	1.000	-1.551	.351
		air 25%	-3.5667	.2440	.000	-4.518	-2.615
		ekstrak 25%	2.8333	.2440	.000	1.882	3.785
		n-heksana 12,5%	12.2667	.2440	.000	11.315	13.218
		etil asetat 12,5%	12.2667	.2440	.000	11.315	13.218
		air 12,5%	-1.0000	.2440	.029	-1.951	-.049
		ekstrak 12,5%	12.2667	.2440	.000	11.315	13.218
		kontrol +	-19.2000	.2440	.000	-20.151	-18.249

	kontrol -	12.2667	.2440	.000	11.315	13.218
n-heksana 25%	n-heksana 50%	-1.6333	.2440	.000	-2.585	-.682
	etil asetat 50%	-2.7333	.2440	.000	-3.685	-1.782
	air 50%	-7.9667	.2440	.000	-8.918	-7.015
	ekstrak 50%	-1.1333	.2440	.007	-2.085	-.182
	etil asetat 25%	-1.7333	.2440	.000	-2.685	-.782
	air 25%	-4.7000	.2440	.000	-5.651	-3.749
	ekstrak 25%	1.7000	.2440	.000	.749	2.651
	n-heksana 12,5%	11.1333	.2440	.000	10.182	12.085
	etil asetat 12,5%	11.1333	.2440	.000	10.182	12.085
	air 12,5%	-2.1333	.2440	.000	-3.085	-1.182
	ekstrak 12,5%	11.1333	.2440	.000	10.182	12.085
	kontrol +	-20.3333	.2440	.000	-21.285	-19.382
	kontrol -	11.1333	.2440	.000	10.182	12.085
etil asetat 25%	n-heksana 50%	.1000	.2440	1.000	-.851	1.051
	etil asetat 50%	-1.0000	.2440	.029	-1.951	-.049
	air 50%	-6.2333	.2440	.000	-7.185	-5.282
	ekstrak 50%	.6000	.2440	1.000	-.351	1.551
	n-heksana 25%	1.7333	.2440	.000	.782	2.685
	air 25%	-2.9667	.2440	.000	-3.918	-2.015
	ekstrak 25%	3.4333	.2440	.000	2.482	4.385
	n-heksana 12,5%	12.8667	.2440	.000	11.915	13.818
	etil asetat 12,5%	12.8667	.2440	.000	11.915	13.818
	air 12,5%	-.4000	.2440	1.000	-1.351	.551
	ekstrak 12,5%	12.8667	.2440	.000	11.915	13.818
	kontrol +	-18.6000	.2440	.000	-19.551	-17.649
	kontrol -	12.8667	.2440	.000	11.915	13.818
air 25%	n-heksana 50%	3.0667	.2440	.000	2.115	4.018
	etil asetat 50%	1.9667	.2440	.000	1.015	2.918
	air 50%	-3.2667	.2440	.000	-4.218	-2.315
	ekstrak 50%	3.5667	.2440	.000	2.615	4.518
	n-heksana 25%	4.7000	.2440	.000	3.749	5.651
	etil asetat 25%	2.9667	.2440	.000	2.015	3.918
	ekstrak 25%	6.4000	.2440	.000	5.449	7.351
	n-heksana 12,5%	15.8333	.2440	.000	14.882	16.785
	etil asetat 12,5%	15.8333	.2440	.000	14.882	16.785
	air 12,5%	2.5667	.2440	.000	1.615	3.518
	ekstrak 12,5%	15.8333	.2440	.000	14.882	16.785
	kontrol +	-15.6333	.2440	.000	-16.585	-14.682
	kontrol -	15.8333	.2440	.000	14.882	16.785
ekstrak 25%	n-heksana 50%	-3.3333	.2440	.000	-4.285	-2.382
	etil asetat 50%	-4.4333	.2440	.000	-5.385	-3.482
	air 50%	-9.6667	.2440	.000	-10.618	-8.715
	ekstrak 50%	-2.8333	.2440	.000	-3.785	-1.882
	n-heksana 25%	-1.7000	.2440	.000	-2.651	-.749
	etil asetat 25%	-3.4333	.2440	.000	-4.385	-2.482
	air 25%	-6.4000	.2440	.000	-7.351	-5.449
	n-heksana 12,5%	9.4333	.2440	.000	8.482	10.385
	etil asetat 12,5%	9.4333	.2440	.000	8.482	10.385
	air 12,5%	-3.8333	.2440	.000	-4.785	-2.882
	ekstrak 12,5%	9.4333	.2440	.000	8.482	10.385
	kontrol +	-22.0333	.2440	.000	-22.985	-21.082

	kontrol -	9.4333	.2440	.000	8.482	10.385
n-heksana 12,5%	n-heksana 50%	-12.7667	.2440	.000	-13.718	-11.815
	etil asetat 50%	-13.8667	.2440	.000	-14.818	-12.915
	air 50%	-19.1000	.2440	.000	-20.051	-18.149
	ekstrak 50%	-12.2667	.2440	.000	-13.218	-11.315
	n-heksana 25%	-11.1333	.2440	.000	-12.085	-10.182
	etil asetat 25%	-12.8667	.2440	.000	-13.818	-11.915
	air 25%	-15.8333	.2440	.000	-16.785	-14.882
	ekstrak 25%	-9.4333	.2440	.000	-10.385	-8.482
	etil asetat 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
	air 12,5%	-13.2667	.2440	.000	-14.218	-12.315
	ekstrak 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
	kontrol +	-31.4667	.2440	.000	-32.418	-30.515
	kontrol -	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
etil asetat 12,5%	n-heksana 50%	-12.7667	.2440	.000	-13.718	-11.815
	etil asetat 50%	-13.8667	.2440	.000	-14.818	-12.915
	air 50%	-19.1000	.2440	.000	-20.051	-18.149
	ekstrak 50%	-12.2667	.2440	.000	-13.218	-11.315
	n-heksana 25%	-11.1333	.2440	.000	-12.085	-10.182
	etil asetat 25%	-12.8667	.2440	.000	-13.818	-11.915
	air 25%	-15.8333	.2440	.000	-16.785	-14.882
	ekstrak 25%	-9.4333	.2440	.000	-10.385	-8.482
	n-heksana 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
	air 12,5%	-13.2667	.2440	.000	-14.218	-12.315
	ekstrak 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
	kontrol +	-31.4667	.2440	.000	-32.418	-30.515
	kontrol -	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
air 12,5%	n-heksana 50%	.5000	.2440	1.000	-.451	1.451
	etil asetat 50%	-.6000	.2440	1.000	-1.551	.351
	air 50%	-5.8333	.2440	.000	-6.785	-4.882
	ekstrak 50%	1.0000	.2440	.029	.049	1.951
	n-heksana 25%	2.1333	.2440	.000	1.182	3.085
	etil asetat 25%	.4000	.2440	1.000	-.551	1.351
	air 25%	-2.5667	.2440	.000	-3.518	-1.615
	ekstrak 25%	3.8333	.2440	.000	2.882	4.785
	n-heksana 12,5%	13.2667	.2440	.000	12.315	14.218
	etil asetat 12,5%	13.2667	.2440	.000	12.315	14.218
	ekstrak 12,5%	13.2667	.2440	.000	12.315	14.218
	kontrol +	-18.2000	.2440	.000	-19.151	-17.249
	kontrol -	13.2667	.2440	.000	12.315	14.218
ekstrak 12,5%	n-heksana 50%	-12.7667	.2440	.000	-13.718	-11.815
	etil asetat 50%	-13.8667	.2440	.000	-14.818	-12.915
	air 50%	-19.1000	.2440	.000	-20.051	-18.149
	ekstrak 50%	-12.2667	.2440	.000	-13.218	-11.315
	n-heksana 25%	-11.1333	.2440	.000	-12.085	-10.182
	etil asetat 25%	-12.8667	.2440	.000	-13.818	-11.915
	air 25%	-15.8333	.2440	.000	-16.785	-14.882
	ekstrak 25%	-9.4333	.2440	.000	-10.385	-8.482
	n-heksana 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
	etil asetat 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
	air 12,5%	-13.2667	.2440	.000	-14.218	-12.315
	kontrol +	-31.4667	.2440	.000	-32.418	-30.515

	kontrol -	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
kontrol +	n-heksana 50%	18.7000 [†]	.2440	.000	17.749	19.651
	etil asetat 50%	17.6000 [†]	.2440	.000	16.649	18.551
	air 50%	12.3667 [†]	.2440	.000	11.415	13.318
	ekstrak 50%	19.2000 [†]	.2440	.000	18.249	20.151
	n-heksana 25%	20.3333 [†]	.2440	.000	19.382	21.285
	etil asetat 25%	18.6000 [†]	.2440	.000	17.649	19.551
	air 25%	15.6333 [†]	.2440	.000	14.682	16.585
	ekstrak 25%	22.0333 [†]	.2440	.000	21.082	22.985
	n-heksana 12,5%	31.4667 [†]	.2440	.000	30.515	32.418
	etil asetat 12,5%	31.4667 [†]	.2440	.000	30.515	32.418
	air 12,5%	18.2000 [†]	.2440	.000	17.249	19.151
	ekstrak 12,5%	31.4667 [†]	.2440	.000	30.515	32.418
	kontrol -	31.4667 [†]	.2440	.000	30.515	32.418
kontrol -	n-heksana 50%	-12.7667 [†]	.2440	.000	-13.718	-11.815
	etil asetat 50%	-13.8667 [†]	.2440	.000	-14.818	-12.915
	air 50%	-19.1000 [†]	.2440	.000	-20.051	-18.149
	ekstrak 50%	-12.2667 [†]	.2440	.000	-13.218	-11.315
	n-heksana 25%	-11.1333 [†]	.2440	.000	-12.085	-10.182
	etil asetat 25%	-12.8667 [†]	.2440	.000	-13.818	-11.915
	air 25%	-15.8333 [†]	.2440	.000	-16.785	-14.882
	ekstrak 25%	-9.4333 [†]	.2440	.000	-10.385	-8.482
	n-heksana 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
	etil asetat 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
	air 12,5%	-13.2667 [†]	.2440	.000	-14.218	-12.315
	ekstrak 12,5%	.0000	.2440	1.000	-.951	.951
	kontrol +	-31.4667 [†]	.2440	.000	-32.418	-30.515

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

Homogeneous Subsets

		diameter									
sampel		N	Subset for alpha = 0.05								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tukey HSD ^a	n-heksana 12,5%	3	.000								
	etil asetat 12,5%	3	.000								
	ekstrak 12,5%	3	.000								
	kontrol -	3	.000								
	ekstrak 25%	3		9.433							
	n-heksana 25%	3			11.133						
	ekstrak 50%	3				12.267					
	n-heksana 50%	3				12.767	12.767				
	etil asetat 25%	3				12.867	12.867				
	air 12,5%	3					13.267	13.267			
	etil asetat 50%	3						13.867			
	air 25%	3							15.833		
	air 50%	3								19.100	
	kontrol +	3									31.467
	Sig.			1.000	1.000	1.000	.467	.726	.467	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.