

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR
DARI EKSTRAK ETANOLIK DAUN UNGU (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff)
TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



Oleh :

**Nora Ilham Suryaku
19133850A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA**

2017

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR
DARI EKSTRAK ETANOLIK DAUN WUNGU (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff)
TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



SKRIPSI

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

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

Oleh :

Nora Ilham Suryaku

19133850A

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA**

2017

PENGESAHAN SKRIPSI
berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN
AIR DARI EKSTRAK ETANOLIK DAUN WUNGU (*Graptophyllum pictum* (L.)
Griff) TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Oleh :

Nora Ilham Suryaku
19133850A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 10 Juni 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi

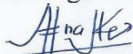

Dekan,
Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt

Pembimbing Utama,



Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt

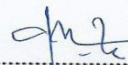
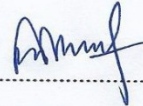
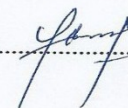

Pembimbing Pendamping,



Dr. Ana Indrayati, M.Si.

Penguji :

1. Opstaria Saptarini, M.Si., Apt
2. Drs. Edy Prasetya, M.Si
3. Dr. Supriyadi, M.Si
4. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt

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

Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt.

Dr. Ana Indrayati, M.Si.

PERSEMBAHAN



Dengan penuh syukur, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, terima kasih atas segala nikmat, kesabaran, dan keikhlasan yang telah engkau berikan.
2. Bapak dan ibu yang selalu mendoakan dan memberikan semangat.
3. Teman-teman dan dosen yang telah membantu atas kelancaran skripsi saya.

PERNYATAAN

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

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

Surakarta, 20 Juni 2017



Nora Ilham Suryaku

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan nikmat dan karunia-Nya yang begitu besar yang selalu menyertai penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOLIK DAUN UNGU (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana 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 juga menyadari skripsi ini dapat terselesaikan tentu tidak terlepas dari bimbingan, pengarahan, saran, dan bantuan dari berbagai pihak sehingga penulis mengucapkan terimakasih kepada yang terhormat :

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA selaku rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt, selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt, selaku pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, saran, masukan, waktu dan ilmunya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si., selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, saran, masukan, waktu dan ilmunya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Opstraria Saptarini, M.Si, Drs. Edy Prasetya, M.Si, serta Dr. Supriyadi, M.Si, selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan kritik dan saran sehingga skripsi ini menjadi lebih baik.

6. Segenap dosen, staff, laboran dan asisten laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan bantuan selama penelitian.
7. Teman kos griyo ijo serta Putri Noor Rohmawati yang selalu mendukung dan memberikan semangat kepada saya.
8. Teman satu tim saya yang telah bersama-sama menyelesaikan penelitian. Teman-teman yang tidak bisa disebutkan satu persatu, selalu mendukung dan membantu hingga skripsi ini selesai.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Semoga Tuhan memberikan limpahan berkat kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa dalam 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 perbaikan penulisan selanjutnya dimasa yang akan datang. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kefarmasian.

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
INTISARI	xv
ABSTRACT	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Kegunaan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Tanaman Daun Ungu	4
1. Sistematika tanaman.....	4
2. Nama lain	4
3. Morfologi tanaman.....	5
4. Kandungan kimia	5
4.1. Flavonoid	5
4.2. Alkaloid.....	5
4.3. Saponin.....	6
4.4. Tanin	6
4.5. Steroid	6
5. Kegunaan daun ungu.....	7
B. Simplisia	7
1. Pengertian simplisia	7
2. Pengambilan simplisia	7
3. Pengeringan simplisia	8
4. Penyerbukan.....	8

C. Pelarut dan Ekstraksi.....	8
1. Pengertian ekstraksi	8
2. Metode ekstraksi (maserasi).....	9
3. Fraksinasi	9
4. Pelarut	10
4.1. Etanol.....	10
4.2. N-Heksan.....	11
4.3. Etil asetat.....	11
4.4. Air	11
D. Kromatografi Lapis Tipis.....	12
E. Sterilisasi	13
F. Tinjauan <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14
1. Sistematika bakteri	14
2. Morfologi	14
3. Metabolit <i>Staphylococcus aureus</i>	15
4. Toksin bakteri	15
5. Patogenesis <i>Staphylococcus aureus</i>	16
6. Pengobatan	17
G. Antibakteri	18
1. Definisi antibakteri.....	18
2. Mekanisme kerja antibakteri.....	18
2.1. Menghambat sintesis dinding sel bakteri.....	18
2.2. Menghambat metabolisme sel bakteri.....	18
2.3. Mengganggu keutuhan dinding sel bakteri.....	19
2.4. Menghambat sintesis protein sel bakteri	19
2.5. Menghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri	19
H. Uji Aktivitas Antibakteri	19
1. Metode difusi	19
2. Metode pengenceran/dilusi	20
I. Media.....	21
J. Amoksisilin	21
K. Landasan Teori.....	22
L. Hipotesis.....	24
 BAB III METODE PENELITIAN	 25
A. Populasi dan Sampel	25
1. Populasi	25
2. Sampel	25

B. Variabel Penelitian	25
1. Identifikasi variabel utama	25
2. Klasifikasi variabel utama	25
2.1 Variabel bebas	26
2.2 Variabel kendali	26
2.3 Variabel tergantung	26
3. Definisi operasional variabel utama	26
C. Bahan dan Alat	27
1. Bahan	27
2. Alat	27
D. Jalannya Penelitian	27
1. Determinasi tanaman ungu	27
2. Pembuatan serbuk daun ungu	28
3. Penetapan kadar air	28
4. Pembuatan ekstrak daun ungu	28
5. Fraksinasi ekstrak daun ungu	28
6. Tes bebas etanolik daun ungu	29
7. Uji kandungan senyawa kimia serbuk, ekstrak dan fraksi daun ungu	29
7.1. Saponin	29
7.2. Tanin	29
7.3. Flavonoid	29
7.4. Alkaloid	30
7.5 Steroid	30
8. Sterilisasi	30
9. Identifikasi bakteri uji <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	30
10.1 Identifikasi bakteri dengan cawan gores	30
10.2 Pewarnaan	31
10.3 Identifikasi biokimia <i>S. aureus</i> ATCC 25923	31
10. Pembuatan biakan dan suspensi bakteri	31
11. Pengujian antibakteri daun ungu secara difusi	32
12. Pengujian antibakteri daun ungu secara dilusi	32
13. Identifikasi golongan senyawa pada fraksi teraktif secara kromatografi lapis tipis	33
13.1 Identifikasi saponin	33
13.2 Identifikasi tanin	33
13.3 Identifikasi flavonoid	33
13.4 Identifikasi alkaloid	34
13.5 Identifikasi Steroid	34
E. Analisis Data	34
F. Skema Jalannya Penelitian	35

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	41
1. Determinasi daun ungu (<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff)	41
2. Pembuatan serbuk daun ungu.....	41
3. Penetapan kadar air	42
4. Pembuatan ekstrak daun ungu.....	42
5. Identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi dari daun ungu	43
6. Uji bebas etanolik ekstrak daun ungu	45
7. Fraksinasi daun ungu	45
8. Identifikasi <i>S. aureus</i> ATCC 25923	47
8.1. Hasil identifikasi koloni <i>S. aureus</i> ATCC 25923	47
8.2. Hasil identifikasi mikroskopis <i>S. aureus</i> ATCC 25923 dengan pewarnaan gram.....	47
8.3. Hasil identifikasi biokimia <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	47
9. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat, dan air dari daun ungu secara difusi.....	48
10. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun ungu dan amoksisilin secara dilusi.....	52
11. Identifikasi fraksi teraktif dengan KLT.....	54
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	57
A. Kesimpulan	57
B. Saran.....	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN	65

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Daun ungu (<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff)	4
Gambar 2. Bentuk mikroskopis <i>S. aureus</i> . (www.publichealthnewswire.org)	14
Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanolik dan fraksinasi daun ungu	35
Gambar 4. Skema pembuatan suspensi bakteri uji 1: 1000	36
Gambar 5. Skema identifikasi bakteri secara makroskopis	37
Gambar 6. Skema pengujian aktivitas daun ungu terhadap <i>S. aureus</i> ATCC 25923 secara difusi	38
Gambar 7. Skema pengujian aktivitas fraksi teraktif ekstrak daun ungu terhadap <i>S.aureus</i> ATCC 25923 secara dilusi	39
Gambar 8. Skema penelitian	40
Gambar 9. Profil kromatogram senyawa flavonoid	56

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Pereaksi semprot untuk melihat visualisasi bercak KLT	13
2. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah	41
3. Hasil penetapan kadar air dengan menggunakan alat <i>Sterling Bidwell</i>	42
4. Hasil pembuatan ekstrak daun ungu secara maserasi	43
5. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak	44
6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia fraksi daun ungu	44
7. Hasil tes bebas etanol ekstrak daun ungu.....	45
8. Perolehan fraksi ekstrak daun ungu	46
9. Hasil diameter daya hambat pada uji antibakteri dari daun ungu secara difusi terhadap <i>S. aureus</i> ATCC 25923	50
10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif etil asetat dan pembanding amoksisilin terhadap <i>S. aureus</i> ATCC 25923	53
11. Hasil identifikasi flavonoid fraksi etil asetat secara KLT	55

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil determinasi daun ungu (<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff)	65
Lampiran 2. Tanaman, simplisia, dan serbuk daun ungu (<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff)	66
Lampiran 3. Sterling-bidwell, Inkubator dan vacuum evaporator	67
Lampiran 4. Foto maserasi dan fraksinasi	68
Lampiran 5. Foto ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksan, etil asetat dan air daun ungu	69
Lampiran 6. Foto hasil uji kandungan senyawa serbuk, ekstrak dan fraksi	70
Lampiran 7. Foto hasil identifikasi koloni, uji biokimia, dan identifikasi mikroskopis <i>S. aureus</i> ATCC 25923	72
Lampiran 8. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi dan ekstrak daun ungu terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara difusi	73
Lampiran 9. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun ungu terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 secara dilusi	74
Lampiran 10. Hasil uji aktivitas antibakteri amoksisilin dan inokulasi amoksisilin terhadap <i>S. aureus</i> ATCC 25923	75
Lampiran 11. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah.....	76
Lampiran 12. Perhitungan penetapan kadar air serbuk daun ungu	77
Lampiran 13. Penetapan persen rendemen ekstrak etanolik daun ungu	78
Lampiran 14. Perhitungan rendemen fraksi etil asetat, <i>n</i> -heksan, dan air dari ekstrak etanolik daun ungu (<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff).....	79
Lampiran 15. Perhitungan nilai Rf analisa Kromatografi Lapis Tipis dari senyawa flavonoid	80

Lampiran 16. Pembuatan seri konsentrasi larutan uji metode difusi	81
Lampiran 17 Perhitungan konsentrasi fraksi etil asetat secara dilusi	82
Lampiran 18. Pembuatan konsentrasi dan dilusi amoksisilin.....	83
Lampiran 19. Analisa ANOVA	85
Lampiran 20. Formulasi dan pembuatan media.....	94

INTISARI

SURYAKU, N.I., 2017, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOLIK DAUN UNGU (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan terbesar di negara berkembang, salah satunya yaitu di Indonesia. *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab 70% kasus infeksi nosokomial dan penyebab infeksi piogenik. Daun ungu diketahui mengandung flavonoid, saponin, tannin, alkaloid, steroid. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) sebagai antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 25923.

Serbuk daun ungu diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, dan difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air yang berbeda polaritasnya. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi menggunakan konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5%. Fraksi teraktif kemudian dilakukan uji dilusi untuk mengetahui KHM dan KBM menggunakan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,563%, 0,80%, 0,40%, 0,20%, 0,10%. Analisis statistik menggunakan ANOVA *oneway* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan dari sediaan uji.

Hasil uji aktivitas antibakteri dari ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dengan metode difusi pada konsentrasi 50% menghasilkan zona hambat sebesar 12,99 mm; 11,33 mm; 17,11 mm; dan 12,77 mm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua fraksi dan ekstrak mempunyai aktivitas antibakteri. Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun ungu mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dengan nilai KBM sebesar 12,5%. Hasil identifikasi fitokimia menunjukkan fraksi etil asetat mengandung flavonoid, alkaloid, dan steroid.

Kata kunci: antibakteri, *staphylococcus aureus*, daun ungu, fraksinasi, difusi, dilusi, *Graptophyllum pictum* (L). Griff

ABSTRACT

SURYAKU, N.I., 2017, ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF n-HEXANE, ETHYL ACETATE AND WATER FRACTIONS FROM ETHANOL EXTRACT OF PURPLE LEAF (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) AGAINST *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, SKRIPSI, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Infection disease is one of the biggest health problems in developing countries, one of which is in Indonesia. *Staphylococcus aureus* is the cause of 70% of cases of nosocomial infections and causes of pyogenic infections. Purple leaf are known to contain flavonoids, saponins, tannins, alkaloids, steroids. The purpose of the study was to determine the activity of n-hexane, ethyl acetate, and water fractions from ethanol extract purple leaf (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) as antibacterial against *S. aureus* ATCC 25923.

The purple leaf powder was extracted using a maceration method with 96% ethanol solvent, then fractionated using n-hexane, ethyl acetate and water solvents with different polarities. The test of the antibacterial activity was performed by using diffusion concentration 50%, 25%, and 12,5%. Then, the most active fractions were diluted to determine MIC and MKC using concentrations of 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.563%, 0.781%, 0.391%, 0.196%, 0.098%. Statistic alanalysis in this study using ANOVA one way to determine whether there is a significant difference from the test preparation.

The results of antibacterial activity test of extract, n-hexane, ethyl acetate, and water fractions with diffusion method at concentration 50% resulted in inhibition zone of 12.99 mm; 11.33 mm; 17.11 mm; And 12.77 mm. The results showed that all fractions and extracts had antibacterial activity. The ethyl acetate fraction of purple leaf's ethanol extract has the most active antibacterial activity against *S. aureus* ATCC 25923 with MKC value of 12.5%. The results of phytochemical identification showed ethyl acetate fraction containing flavonoids, alkaloids, and steroids.

Keywords: Antibacterial, *staphylococcus aureus*, purple leaf, fractionation, diffusion, dilution, *Graptophyllum pictum* (L.) Griff

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan terbesar di negara berkembang, salah satunya yaitu di Indonesia. Indonesia merupakan negara tropis yang beriklim hangat, dimana jenis bakteri yang bersifat patogen akan mudah tumbuh subur. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri yang bersifat patogen pada manusia. *S. aureus* merupakan penyebab 70% kasus infeksi nosokomial dan penyebab infeksi piogenik (menghasilkan pus) pada manusia dan paling sering terjadi. Infeksi nosokomial adalah infeksi yang didapat dari rumah sakit atau ketika penderita itu dirawat di rumah sakit (Nugraheni *et al* 2012). *S. aureus* dapat menyebabkan sepsis pada luka bedah, abses payudara pada ibu-ibu, mata bengkak, bisul, dan lesi kulit pada bayi (Jawetz *et al* 1986). Infeksi merupakan penyumbang nomor satu angka morbiditas dan mortalitas, sehingga penggunaan antibakteri merupakan hal yang penting dalam pelayanan kesehatan.

Pelayanan kesehatan dengan pemakaian herbal dalam 20 tahun terakhir ini menjadi perhatian dunia karena pemakaian obat-obatan tradisional yang terus meningkat, hal ini disebabkan karena penggunaan obat-obatan tradisional telah diterima luas di negara-negara maju maupun berkembang sejak dahulu kala (Depkes RI 2007). Pengetahuan tentang cara penyembuhan terhadap penyakit yang dilakukan oleh nenek moyang zaman dahulu sebenarnya bermanfaat dan aman bagi kesehatan (Hariana 2009).

Saat ini Indonesia merupakan salah satu negara penghasil tanaman obat yang potensial dengan keanekaragaman hayati yang sangat tinggi (*megabiodiversity*) khususnya tumbuhan. Tumbuhan masih merupakan salah satu sumber yang diperlukan dalam dunia medis, banyak tumbuhan yang digunakan sebagai obat penyembuh dan mencegah penyakit. Pengobatan menggunakan obat

yang berasal dari bahan alam lebih banyak disukai dikarenakan biaya yang relatif murah, mudah didapat, serta memiliki efek samping yang relatif lebih rendah dibanding dengan pengobatan secara kimia. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antibakteri *S. aureus* adalah daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff), dimana secara tradisional tanaman ini berkhasiat untuk mengobati berbagai penyakit. Daun, kulit batang, dan bunganya dapat digunakan untuk memperlancar haid, mengobati wasir, sembelit, borok, bisul, bengkak terpukul, dan sakit telinga (Wijayakusuma *et al* 1996; Hariana 2009). Di Ambon-Maluku dan Jayapura Papua, ramuan daun ungu (bahasa Maluku : alifuru) tidak hanya digunakan untuk menyembuhkan bisul tetapi juga digunakan untuk pengobatan penyakit ginjal, diabetes, rematik, dan darah tinggi (Khumaida *et al* 2008).

Daun ungu mempunyai berbagai kandungan kimia yang bersifat sebagai antibakteri, antiinflamasi, peluruh air seni, mempercepat pemasakan bisul, pencahar ringan, pelembut kulit kaki, melunakkan feses dan mengempiskan wasir (Ahmad 1990). Daun ungu diketahui mengandung flavonoid, saponin, tannin, alkaloid, steroid (Arifatin 1999). Penelitian yang dilakukan oleh Proboseno (2011) ekstrak etanol daun ungu memiliki potensi terhadap bakteri *S. aureus* dengan rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak daun ungu kadar 0,25 mg/ml, dan 0,001875 mg/ml berturut-turut adalah 9,1 mm, dan 7,60 mm.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka peneliti tertarik melakukan penelitian untuk menguji potensi fraksi-fraksi daun ungu terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Penelitian ini perlu dilakukan untuk menguji aktivitas fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak daun ungu terhadap *S. aureus*. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan golongan senyawa dan menarik senyawa kimia yang mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* sesuai sifat kepolaran pelarut yang digunakan. Metode yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas dari bakteri *S. aureus* menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa warna jernih yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap

mikroorganisme yang diperiksa (Jawetz *et al* 2007). Metode dilusi berguna untuk mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan mengetahui kadar obat terendah yang dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan mikroorganisme (Bonang & Koeswardono 1982).

B. Perumusan Masalah

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

Pertama, apakah ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun ungu memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 25923?

Kedua, manakah dari fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak daun ungu yang paling aktif terhadap *S. aureus* ATCC 25923?

Ketiga, berapakah nilai KHM dan KBM dari ekstrak dan fraksi teraktif daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923?

C. Tujuan Penelitian

Pertama, untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923.

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

Ketiga, mengetahui nilai KHM dan KBM dari ekstrak dan fraksi teraktif daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923.

D. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar ilmiah penggunaan daun ungu sebagai obat tradisional khususnya sebagai antibakteri terutama terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan menambah informasi tentang sumber obat alami dari tumbuhan yang terdapat di Indonesia.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Daun Ungu

1. Sistematika tanaman

Menurut Kemenkes RI (2011), sistematika *Graptophyllum pictum* (L.) Griff adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub Devisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Bangsa : Solanales
Suku : Acanthaceae
Marga : Graptophyllum
Species : *Graptophyllum Pictum* Griff.



**Gambar 1. Daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff).
Diambil dari B2P2TOOT, Tawangmangu, Jawa Tengah**

2. Nama lain

Daun ungu memiliki nama yang berbeda-beda di setiap daerah yaitu: *pudin* (Sumatera); *daun ungu* (Jawa tengah), *handeleum* (Sunda), *karaton* (Madura), *teman* (Bali), *kadi-kadi* (Ternate), *dongo-dongo* (Tidore) (Kemenkes RI, 2011).

3. Morfologi tanaman

Daun ungu merupakan tanaman perdu dengan tinggi ± 2 m. Batang berkayu, beruas, permukaan licin, ungu kehijauan. Daun tunggal, berhadapan, bulat telur, ujung runcing, pangkal meruncing, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan atas mengkilat, panjang 15-25 cm, lebar 5-11 cm, ungu, ungu tua. Bunga berbentuk majemuk, di ujung batang, pangkal kelopak berlekatan, bagian ujung berbagi lima, ungu, benang sari empat, melekat pada mahkota bunga, tangkai sari ungu, kepala sari ungu kehitaman, putik bentuk tabung, ujung bertajuk lima, ungu. Buah berbentuk kotak, lonjong, ungu kecoklatan. Biji berbentuk bulat berwarna putih, dan akar tunggang berwarna coklat muda (Kemenkes RI, 2011).

4. Kandungan kimia

4.1. Flavonoid. Flavonoid yang terdapat dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin saja terdapat dalam satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida (Harborne 1987). Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang memiliki fungsi sebagai senyawa antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstra seluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Ruban 2012).

4.2. Alkaloid. Sebagian besar alkaloid 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. Sedang substituen oksigen biasanya ditemukan sebagai gugus fenol ($-OH$), metoksil ($-OCH_3$) atau gugus metilendioksi ($-O-CH_2-O$). Substituen-substituen oksigen ini dan gugus N-metil merupakan ciri sebagian besar alkaloid (Lenny 2006).

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

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

Saponin mempunyai efek membranolitik yaitu membentuk kompleks dengan kolesterol di membran sel bakteri. Saponin mempunyai efek antibakteri dan antijamur yang bagus. Efek antijamur dan antibakteri terganggu dengan adanya gugus monosakarida dan turunannya. Saponin dapat berfungsi sebagai detergen. Detergen memiliki struktur yang dapat berikatan dengan molekul hidrofilik dan molekul-molekul organik non polar (lipofilik) sehingga mampu merusak membran sitoplasma dan membunuh mikroba (Cheeke 2000).

4.4. Tanin. Tanin merupakan suatu senyawa polifenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan karboksil. Senyawa tanin terdiri dari dua jenis yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis (Puspawati *et al* 2015).

Tanin memiliki aktivitas antimikroba dengan menginaktifkan adhesin sel mikroba juga menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Sel mikroba menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel mikroba akan mati (Cowan 1999).

4.5. Steroid. Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung sklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Dahulu sering digunakan sebagai hormon kelamin, asam empedu, dll. Tetapi pada tahun-tahun terakhir ini makin banyak senyawa steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan (Harborne 1987; Robinson 1995). Mekanisme steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membrane lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom (Madduluri 2013).

5. Kegunaan daun ungu

Secara tradisional daun, kulit batang, dan bunga dari tanaman ungu dapat digunakan untuk memperlancar haid, mengobati wasir, sembelit, borok, bisul, bengkak terpukul, dan sakit telinga (Wijayakusuma *et al* 1996; Hariana 2009). Di Ambon-Maluku dan Jayapura Papua, ramuan daun ungu (bahasa Maluku : alifuru) tidak hanya digunakan untuk menyembuhkan bisul tetapi juga digunakan untuk pengobatan penyakit ginjal, diabetes, rematik, dan darah tinggi (Khumaida *et al* 2008). Dengan berbagai kandungan kimiawinya daun ungu mempunyai sifat sebagai antibakteri, antiinflamasi, peluruh air seni, mempercepat pemasakan bisul, pencahar ringan, pelembut kulit kaki, melunakkan feaces dan mengempiskan wasir (Ahmad 1990).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia yang merupakan bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI 1995).

Menurut Materia Medika Indonesia simplisia dibedakan menjadi tiga yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, simplisia pelican (mineral). Simplisia nabati merupakan yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan ialah isi sel yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau isi sel yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhan dan belum dalam senyawa kimiawi murni (Depkes RI 1995).

2. Pengambilan simplisia

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

3. Pengeringan simplisia

Tujuan pengeringan simplisia adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah ruak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Penurunan mutu atau kerusakan simplisia dicegah dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik. Air yang masih tersisa dalam simplisia pada kadar tertentu dapat menjadi media pertumbuhan kapang dan jasad renik lainnya. Simplisia dinilai cukup aman bila mempunyai kadar air kurang dari 10% (Harborne 1987).

4. Penyerbukan

Penyerbukan dimaksudkan agar meningkatkan luas permukaan dari bahan, sehingga senyawa kimia dalam tumbuhan dapat ditarik secara optimal. Daun yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan blender atau grinding dan diayak dengan ayakan nomor 40 mesh, kemudian dilakukan perhitungan bobot kering terhadap bobot basah daun ungu (Voigt 1995).

C. Pelarut dan Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kering, kental, dan cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani dengan cara yang cocok di luar pengaruh cahaya matahari langsung. Ekstraksi yaitu penarikan zat yang diinginkan dari bahan obat dengan menggunakan pelarut yang sesuai dimana zat yang diinginkan dapat larut. Bahan mentah obat berasal dari tumbuh-tumbuhan atau hewan yang perlu diproses lebih lanjut, kecuali hanya untuk dikumpulkan dan dikeringkan karena tiap bahan mentah obat berisi sejumlah unsur yang dapat larut dalam pelarut tertentu (Ansel 1989).

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

diantaranya adalah waktu pengestraksian, keasaman (pH), suhu dan perbandingan sampel dengan pelarut (Handa *et al* 2008).

Metode ekstraksi banyak macamnya diantaranya adalah maserasi, perkolasi, destilasi dan sokletasi. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat bahan mentah obat, daya penyesuaian tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna (Ansel 1989). Penelitian ini menggunakan metode maserasi yang kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi.

2. Metode ekstraksi (maserasi)

Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Proses maserasi dimulai dengan merendam simplisia yang sudah dihaluskan menjadi serbuk dalam larutan penyari sampai meresap dan susunan sel akan melunak sehingga zat-zat yang mudah larut akan terlarut (Ansel 1989).

Larutan zat aktif pada serbuk simplisia terjadi karena cairan penyari menembus dinding sel dan masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif kemudian terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel yang menyebabkan zat aktif terlarut. Penyarian yang kurang sempurna dan lama merupakan kekurangan dari metode maserasi. Pada umumnya maserasi dilakukan dengan cara merendam seluruh bagiana simplisia dengan derajat halus yang sesuai kedaalam suatu bejana. Simplisia ditambahkan dengan 75 bagian cairan penyari. Maserasi harus terlindung dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk, dan dibiarkan selama 5 hari, dan setelaah 5 hari disaring dengan kain flannel. Cairan penyari secukupnya ditambahkan pada ampas, diaduk dan di saring sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Keuntungan dari metode maserasi adalah teknik pengerjaan sederhana, alat yang digunakan sederhana, dan dapat mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil (Depkes RI 1986).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tumbuhan. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar. Pertama-tama ekstrak

kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Masing-masing pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari dengan pelarut polar (Harbone 1987).

Fraksinasi digunakan ekstraksi cair-cair yang bersifat sederhana, bersih, cepat dan mudah. Ekstraksi cair-cair adalah suatu teknik bila suatu larutan dibuat bersentuhan dengan suatu pelarut kedua (biasanya organik), yang pada hakekatnya tidak tercampurkan dengan pelarut pertama dan menimbulkan perpindahan satu atau lebih zat terlarut ke dalam pelarut yang kedua. Pemisahan dilakukan dengan mengocok-ngocok dalam sebuah corong pemisah selama beberapa menit. Faktor yang mempengaruhi dalam kesempurnaan ekstraksi adalah jenis pelarut dimana pelarut polar akan melarutkan lebih baik zat polar dan pelarut non polar juga akan melarutkan lebih baik untuk zat yang bersifat non polar. Volume pelarut, jumlah ekstraksi, dan pH juga mempengaruhi kesempurnaan dalam ekstraksi. Zat aktif yang digunakan pada umumnya bersifat asam lemah dan basa lemah dimana kelarutannya dipengaruhi oleh pH larutannya (Basset *et al* 1994).

4. Pelarut

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

4.1. Etanol. Aktivitas tinggi ekstrak etanol dibandingkan dengan ekstrak air dapat dikaitkan dengan adanya jumlah yang lebih tinggi polifenol dibandingkan dengan ekstrak air. Etanol lebih menembus membran sel dalam mengestrak bahan intraseluler dari 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 dibandingkan etanol. Sifat metanol lebih sitotoksik, sehingga tidak cocok untuk ekstraksi dalam beberapa jenis penelitian karena mengakibatkan salah hasil (Tiwari *et al* 2011).

4.2. *n*-Heksan. *n*-heksan adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih terdiri dari suatu campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna atau pucat, transparan, bersifat volatile, mudah terbakar, bau karakteristik, tidak dapat larut dengan air, dapat larut dengan alkohol, benzen, kloroform, eter (Tiwari *et al.* 2011). Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksan yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti lemak dan asam lemak tinggi, steroid, terpenoid, triterpenoid, dan karotenoid (Depkes RI 1987).

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

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

D. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah suatu metode untuk pemisahan dan alat uji senyawa kimia secara kualitatif dan kuantitatif. Senyawa yang diuji dapat berupa senyawa tunggal maupun campuran dari produk pabrik, hasil sintesis, isolasi dari hewan percobaan, maupun dari tanaman dan mikroorganisme. KLT merupakan metode yang mudah penggunaannya, murah, selektif, walaupun sekarang telah dikembangkan (Sumarno 2000).

Pemisahan komponen kimia berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi, yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen), komponen kimia bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya, hal ini yang menyebabkan terjadinya pemisahan. Fase diam (adsorben) yang umum digunakan adalah silika gel, alumunium oksida, kieselgur, selulosa dan turunannya, poliamid, dan lain-lain. Fase diam yang paling banyak digunakan yaitu silika gel karena menghasilkan perbedaan dalam efek pemisahan tergantung pada cara pembuatannya (Stahl 1985). Mekanisme kerja pemisahan KLT dengan fase diam silika gel secara partisi cairan (Mursyidi 1990).

Fase gerak (eluen) merupakan medium yang terdiri dari satu atau lebih pelarut yang bergerak dalam fase diam, yaitu suatu lapisan berpori karena adanya gaya kapiler yang menyebabkan pelarut merambat naik ke atas sehingga terjadi proses pemisahan campuran cuplikan (Stahl 1985). Contoh beberapa pereaksi semprot adalah sebagai berikut (Sarker *et al* 2005) :

Table 1. Pereaksi semprot

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

E. Sterilisasi

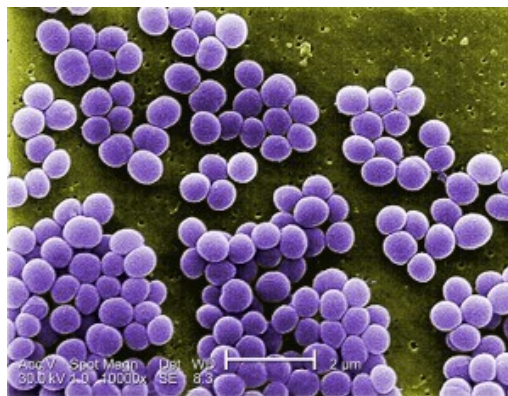
Sterilisasi yaitu suatu usaha untuk menghilangkan atau membunuh mikroorganisme yang ada pada alat-alat atau bahan-bahan yang tidak steril. Bahan ataupun alat harus dalam keadaan steril, artinya pada alat atau bahan tersebut tidak boleh mengandung mikroba yang tidak diharapkan karena dapat mengganggu kehidupan atau proses yang sedang dikerjakan. Metode sterilisasi ada tiga macam yaitu sterilisasi secara fisik, sterilisasi mekanik, dan sterilisasi kimiawi. Sterilisasi fisik misalnya dengan pemanasan, penggunaan sinar dengan panjang gelombang yang pendek misalnya sinar X, sinar UV, dan sinar gamma. Sterilisasi mekanik dengan menggunakan filter atau saringan. Sterilisasi kimia misalnya dengan penggunaan desinfektan, alkohol, formalin campuran HCL dengan Hg, dan sebagainya (Suriawiria 1986).

F. Tinjauan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1. Sistematika bakteri

Menurut Garrity *et al* (2007), sistematika ilmiah bakteri *S. aureus* sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacili
Order	: Bacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i>



Gambar 2. Bentuk mikroskopis *S. aureus*.
(www.publichealthnewswire.org)

2. Morfologi

S. aureus adalah bakteri berbentuk bulat dengan diameter kira-kira 0,7-1,2 μm , biasanya hidup bergerombol seperti buah anggur. *S. aureus* mudah tumbuh dalam keadaan aerob maupun mikro-aerob pada suhu optimum 37⁰C. Koloni pada medium padat berbentuk bulat, halus, menonjol, dan berkilau. *S. aureus* membentuk pigmen berwarna kuning emas.

S. aureus adalah bakteri Gram positif, biasanya tersusun dalam rangkaian tidak beraturan. Beberapa diantaranya tergolong flora normal pada kulit dan selaput mukosa manusia, menyebabkan penanahan, abses, berbagai infeksi, dan bahkan septikemia yang fatal. *S. aureus* mengandung polisakarida dan protein

yang berfungsi sebagai antigen dan merupakan substansi penting di dalam struktur dinding sel, tidak membentuk spora, dan tidak membentuk flagel.

S. aureus dapat meragikan banyak karbohidrat dengan lambat. *S. aureus* relatif tahan terhadap pengeringan dan terhadap panas (tahan suhu 50°C selama 30 menit). Banyak strain resisten terhadap penisilin karena membentuk penisilinase (beta-laktam), suatu enzim yang merusak penisilin dengan memecahkan cincin beta-laktam. Pembentukannya diatur oleh plasmid yang dapat dipindahkan oleh bakteriofage (transduksi). Plasmid juga membawa kontrol genetik resistensi terhadap antibiotik lainnya, misalnya tetrasiklin dan eritromisin.

S. aureus bersifat koagulase positif, yang membedakannya dari spesies yang lain. *S. aureus* biasanya membentuk koloni berwarna abu-abu hingga kuning emas pekat. *S. aureus* tumbuh dengan mudah pada sebagian besar media bakteriologis dengan kondisi aerob atau mikro aerofilik, tumbuh dengan cepat pada 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada temperatur ruang (20-25°C). Koloni pada media padat berbentuk bulat, halus, timbul, dan mengkilat (Jawetz *et al* 2007).

3. Metabolit *S. aureus*

S. aureus menghasilkan tiga macam metabolit non toksin, eksotoksin, dan enterotoksin. Metabolit yang termasuk non toksik adalah antigen permukaan, koagulase, hialuronidase, fibrinolisin, gelatinase, lipase, tributirinase, fosfatase, dan katalase. Metabolit yang termasuk eksotoksin terdiri dari alfa hemolisin, beta hemolisin, delta hemolisin, leukosidin, sitotoksin, dan toksin eksfoliatif. Metabolit enterotoksin terdiri dari protein yang bersifat non hemolitik, non dermonekrotik, non paralitik, termostabil tahan dalam air mendidih selama 30 menit. Tahan terhadap pepsin dan tripsin (Warsa 1993).

4. Toksin bakteri

Keracunan makanan oleh bakteri *S. aureus* terjadi karena termakannya toksin yang dihasilkan oleh toksigenik *S. aureus* yang ada pada makanan tercemar (Pelezar 1988). Infeksi akan lebih berat jika menyerang anak-anak, usia lanjut, dan orang yang daya tahan tubuhnya menurun, seperti pada penderita diabetes, luka bakar, dan AIDS (Etjang 2003). *S. aureus* juga dapat menyebabkan

keracunan makanan akibat enterotoksin yang dihasilkan serupa sindrom renjat toksin (*toxic shock syndrome*) akibat pelepasan antigen ke dalam aliran darah (Radji 2011).

5. Patogenesis *S. aureus*

Pada tahun 1950-an dan awal tahun 1960, *S. aureus* merupakan penyebab utama infeksi nosokomial dan menjadi masalah yang berkepanjangan dibidang klinik. Walaupun saat ini infeksi nosokomial lebih sering disebabkan oleh *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*, infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus* tetap menjadi masalah dalam bidang kesehatan. Tingginya angka kesakitan dan multiresistensi terhadap antibiotik disebabkan oleh hal-hal berikut antara lain gen tertentu pada bakteri yang mengalami mutasi sehingga bakteri kenal terhadap antibiotik tertentu dan bakteri mendapatkan gen resistensi ekstrakromosal melalui proses transformasi, transduksi, transposon, ataupun melalui pemindahan fragmen DNA lainnya (Radji 2011).

Bakteri *Staphylococcus* ini dapat ditemukan di udara dan lingkungan sekitar kita. Patogenesitas penyebab infeksi oleh *Staphylococcus* ini dapat terjadi dengan mekanisme antara lain; pelekatan protein sel inang, invasi, perlawanan terhadap system pertahanan inang, dan pelepasan berbagai jenis toksin (Radji 2011). Patogenitasnya merupakan gabungan dari berbagai macam metabolit yang dihasilkannya. Bakteri *Staphylococcus* bersifat invasif, penyebab hemolisis, membentuk koagulasi, mencairkan gelatin, membentuk pigmen kuning emas, dan meragi manitol (Warsa 1993).

Staphylococcus menyebabkan berbagai jenis infeksi pada manusia, antara lain infeksi pada kulit, seperti bisul dan furunkulosis, infeksi yang lebih serius, seperti pneumonia, mastitis, flebitis, meningitis, dan infeksi pada saluran urin. Bakteri *S. aureus* juga menyebabkan infeksi kronis, seperti osteomielitis dan endokarditis. *S. aureus* merupakan salah satu penyebab utama infeksi nosokomial akibat luka tindakan operasi dan pemakaian alat-alat perlengkapan perawatan di rumah sakit (Radji 2011).

Respon sel inang dimediasi oleh leukosit yang diperoleh dari ekspresi molekul adhesi pada sel endotel. Komponen dinding sel dari *Staphylococcus* yaitu

peptidoglikan dan asam teikoat, memacu pelepasan sitokin. Leukosit dan faktor sel inang lainnya dapat dirusak secara lokal oleh toksin yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Adanya protein yang terdapat pada bakteri mengakibatkan respon antiinflamasi. Protein ini juga menghambat sekresi leukosit sel inang dengan cara berinteraksi langsung dengan protein sel inang dan fibrinogen. Apabila tubuh tidak cukup berhasil mengatasi infeksi tersebut maka akan terjadi inflamasi lokal (Todar 2005).

6. Pengobatan

Pengobatan *S. aureus* untuk kasus ringan di luar rumah sakit dapat diberikan penisilin G. Infeksi yang berat atau oleh *S. aureus* yang resisten terhadap penisilin, dapat diberikan metisilin atau derivat penisilin lain yang resisten penisilin (Warsa 1993). Pengobatan *S. aureus* meliputi penyakit abses, bakterimia, endokarditis, pneumonia, osteomielitis, selulitis dapat diterapi dengan berbagai macam prioritas pemilihan obat yang sesuai melalui uji sensitivitas masing-masing antibiotik tersebut.

Pasien yang terkena abses peka terhadap penisilin pemberian pilihan meliputi terapi pertama menggunakan nafsilin atau oksasilin, alternatif terapi kedua menggunakan sefalosforin generasi pertama, kedua, ketiga secara berurutan, dan terapi ketiga menggunakan klindamisin. Pasien bakterimia menggunakan terapi alternatif kedua dengan menggunakan vankomisin dan pneumonia menggunakan terapi alternatif trimetoprim-sulfametoksazole ditambah rifampisin. Pasien selulitis resistensi metisilin pemberian pilihan terapinya meliputi terapi pertama menggunakan vankomisin, alternatif terapi kedua menggunakan kuinupristin-dalfopristin, dan terapi ketiga menggunakan linezolid (Goodman & Gliman 2007). Pengobatan terapi profilaksis operasi dengan kemungkinan terinfeksi *S. aureus* dapat diberikan sefazolin, klindamisin pada saat induksi anestesi (Bennet 2006).

G. Antibakteri

1. Definisi antibakteri

Antibakteri adalah bahan atau obat yang dapat membasmi bakteri khususnya mikroba yang merugikan bagi manusia berdasarkan sifat toksisitas selektif. Antibakteri dapat berupa zat yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri disebut bakterisid (Ganiswarna 2009).

2. Mekanisme kerja antibakteri

Mekanisme kerja antibakteri merupakan peristiwa penghambatan pertumbuhan suatu bakteri oleh senyawa antibakteri. Berdasarkan mekanisme kerjanya antibiotik dibagi menjadi 5 kelompok.

2.1. Menghambat sintesis dinding sel bakteri. Mekanisme kerusakan dinding sel dapat disebabkan oleh adanya akumulasi komponen lipofilik yang terdapat pada dinding sel atau membran sel sehingga menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel. Dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida) (Ganiswara 2005). Mekanismenya yaitu dengan merusak lapisan peptidoglikan dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Gan *et al* 1987).

2.2. Menghambat metabolisme sel bakteri. Senyawa antibakteri dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme dengan cara mengganggu aktivitas enzim-enzim metabolik. Mikroba memerlukan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari Asam Para Amino Benzoat (PABA) untuk kelangsungan hidupnya (Ganiswara 2005). Antibakteri akan bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat, maka akan terbentuk analog asam folat non fungsional, sehingga kebutuhan akan asam folat tidak terpenuhi dan hal ini bisa menyebabkan bakteri mati (Gan *et al* 1987).

2.3. Mengganggu keutuhan dinding sel bakteri. Sel bakteri dikelilingi oleh struktur kaku yang disebut dinding sel, yang melindungi sitoplasma. Adanya tekanan osmotik dalam sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis yang merupakan dasar efek bakterisidal pada bakteri yang peka (Maryuni 2008).

Membran sel merupakan penghalang (*barrier*) yang selektif dalam meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Adanya kerusakan struktur pada membran sel dapat menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba seperti protein, asam nukleat, nukleotida dan mengganggu sejumlah proses biosintesis yang diperlukan dalam membran (Gan *et al* 1987).

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

2.5. Menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri. Rifampisin dan golongan kuinolon merupakan contoh antibiotik yang bekerja dengan menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba (Ganiswara 2005). Rifampisin berikatan dengan enzim polimerase RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA sel mikroba, selain itu golongan kuinolon yang menghambat enzim DNA girase pada kuman yang berfungsi membentuk kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa memuat sel kuman yang kecil sekalipun (Gan *et al* 1987).

H. Uji Aktivitas Antibakteri

1. Metode difusi

Metode difusi merupakan metode yang paling sering digunakan. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa zona jernih yang dianggap sebagai ukuran kekuatan

hambatan terhadap mikroba yang diperiksa (Jawetz *et al* 2007). Metode ini dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu metode silinder, metode lubang/sumur, dan metode cakram kertas/*disc diffusion*.

Metode sumur yaitu membuat lubang pada agar padat yang diinokulasi mikroba. Kemudian lubang diisi dengan ekstrak yang akan diuji. Setelah itu diinkubasi, kemudian pertumbuhan mikroba diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Kusmayati & Agustini 2007). Diameter zona bening yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan mikroba oleh suatu senyawa antimikroba dalam ekstrak (Hermawan *et al* 2007).

Faktor-faktor yang mempengaruhi metode difusi agar yaitu pradifusi, ketebalan medium agar, ketebalan inokulum, komposisi media agar, suhu inkubasi, dan pengaruh pH. Ketebalan medium agar penting untuk memperoleh sensitivitas yang optimal. Perbedaan ketebalan media agar mempengaruhi difusi dari zat uji ke dalam agar, sehingga akan mempengaruhi diameter hambatan. Makin tebal media yang digunakan akan makin kecil diameter hambatan yang terjadi (Bonang & Koeswardono 1982).

2. Metode pengenceran/dilusi

Metode dilusi berguna untuk mencari KHM dan KBM dengan mengetahui kadar obat terendah yang dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan mikroba (Bonang & Koeswardono 1982). Keuntungan metode dilusi adalah bahan uji lebih mudah berinteraksi dengan bakteri karena suspensi bakteri tersebar merata sehingga metode ini lebih peka. Kekurangan metode ini adalah memerlukan waktu relatif lebih lama, tidak praktis (Jawetz *et al* 1986).

Prinsip metode dilusi adalah senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi. Kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair, lalu diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri, yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Larutan uji senyawa antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa ada pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM, selanjutnya KHM tersebut dikultur ulang pada media agar tanpa penambahan bakteri uji ataupun

senyawa antibakteri, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media agar yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi 2008).

I. Media

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

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

J. Amoksisilin

Sebagian besar galur *Staphylococcus* sudah resisten terhadap berbagai antibiotik, seperti penisilin, metilpenisilin, sefalosporin, eritromisin, linkomisin, vankomisin, dan rifampisin, sehingga perlu diberi antibiotik berspektrum lebih luas seperti kloramfenikol, amoksisilin, dan tetrasiklin (Jawetz *et al* 2005). Berdasarkan uji sensitifitas terhadap amoksisilin sebagian besar isolat *S. aureus* sensitif terhadap amoksisilin. Amoksisilin merupakan antibakteri spektrum luas yang bersifat bakterisid dan efektif terhadap sebagian bakteri Gram positif dan

beberapa Gram negatif patogen. Bakteri patogen yang sensitif terhadap amoksisilin salah satunya yaitu *S. aureus* (Amalia 2013). Amoksisilin merupakan antibiotik golongan penisilin berspektrum luas. Antibiotik ini stabil dalam suasana asam dan dirancang untuk penggunaan oral. Absorpsi amoksisilin di gastrointestinal lebih cepat dan lebih sempurna dari pada ampisilin karena absorpsi amoksisilin tidak terganggu dengan adanya makanan dalam lambung. Spektrum antimikroba amoksisilin pada dasarnya sama dengan ampisilin, tetapi amoksisilin tampaknya tidak begitu efektif untuk shigelosis dibandingkan ampisilin (Goodman & Gilman 2007).

K. Landasan Teori

Secara tradisional daun ungu berkhasiat untuk mengobati berbagai penyakit. Daun, kulit batang, dan bunganya dapat digunakan untuk memperlancar haid, mengobati wasir, sembelit, borok, bisul, dan sakit telinga (Wijayakusuma *et al* 1996; Hariana 2009). Di Ambon-Maluku dan Jayapura Papua, ramuan daun ungu (bahasa Maluku : alifuru) tidak hanya digunakan untuk menyembuhkan bisul tetapi juga digunakan untuk pengobatan penyakit ginjal, diabetes, rematik, dan darah tinggi (Khumaida *et al* 2008).

Daun ungu mempunyai berbagai kandungan kimia yang bersifat sebagai antibakteri, antiinflamasi, peluruh air seni, mempercepat pemasakan bisul, pencahar ringan, pelembut kulit kaki, melunakkan feaces, dan mengempiskan wasir (Ahmad 1990). Daun ungu diketahui mengandung flavonoid, saponin, tanin, alkaloid, steroid (Arifatin 1999). Penelitian yang dilakukan oleh Proboseno (2011) ekstrak etanol daun ungu memiliki potensi terhadap *S. aureus* dengan rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak daun ungu kadar 0,25 mg/ml, dan 0,001875 mg/ml berturut-turut adalah 9,1 mm, dan 7,60 mm.

Daun ungu merupakan tanaman yang satu familia dengan daun jeruju yaitu Acanthaceae. Secara kemitaksonomi suatu tanaman dengan familia yang sama kemungkinan mempunyai sifat kandungan kimia dan sifat antibakteri yang hampir sama. Daun ungu dan daun jeruju mengandung flavonoid jenis flavon (Soediro I *et al* 2003; Defonda *et al* 2010). Senyawa flavonoid jenis flavon merupakan suatu

senyawa kimia yang dapat larut dengan baik pada pelarut semi polar seperti etil asetat. Pada penelitian yang dilakukan oleh Gina Septiani, dkk (2013) fraksi etil asetat daun jeruju menunjukkan daya hambat terbaik terhadap *Vibrio harveyi* yaitu 12 mm pada konsentrasi 700 ppm.

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi dengan cairan penyari etanol 96%. Hasil dari ekstraksi dengan metode maserasi tersebut dilanjutkan dengan fraksinasi untuk mendapatkan fraksi aktif. Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan golongan utama. Pemisahan ini didasarkan pada perbedaan kepolaran dalam suatu senyawa. Ada 3 macam pelarut didasarkan pada perbedaan kepolarannya yang digunakan dalam fraksinasi adalah *n*-heksana (non polar), etil asetat (semi polar), dan air (polar). *n*-Heksan merupakan pelarut nonpolar yang dapat menyari senyawa nonpolar seperti minyak lemak dan minyak atsiri, steroid, tritepenoid dan karotenoid (Depkes 1985). Etil asetat merupakan pelarut semipolar yang dapat melarutkan senyawa semipolar seperti flavonoid, alkaloid, polifenol (Harborne 1987). Air sebagai pelarut polar yang melarutkan senyawa polar seperti glikosida, tanin, saponin dan gula (Depkes 1986).

Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode dilusi dan metode difusi. Metode difusi adalah salah satu uji yang dapat dilakukan untuk mengetahui aktivitas suatu antibiotik terhadap bakteri uji. Uji difusi memberi hasil diameter zona hambat. Metode difusi dapat digunakan untuk mengetahui daerah hambat yang terbentuk mengelilingi obat berupa warna jernih yang dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap mikroba yang diperiksa (Jawetz *et al* 2007). Metode dilusi berguna untuk mencari KHM dan KBM dengan mengetahui kadar obat terendah yang dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan mikroba (Bonang & Koeswardono 1982). Larutan uji senyawa antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa ada pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM, selanjutnya KHM tersebut dikultur pada media agar tanpa penambahan mikroba uji ataupun senyawa antibakteri, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media agar yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM

(Pratiwi 2008). Sebagai kontrol positif dalam penelitian ini dapat digunakan amoksisilin.

L. Hipotesis

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

Pertama, ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun ungu memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 25923.

Kedua, fraksi etil asetat dari daun ungu merupakan fraksi yang paling aktif terhadap *S. aureus* ATCC 25923.

Ketiga, nilai KHM dan KBM dari ekstrak dan fraksi teraktif daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dapat ditentukan.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ungu yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) pada bulan November 2016 di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun ungu yang di ambil secara acak dengan memilih daun yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, berwarna ungu muda sampai dengan ungu tua, segar dan bebas dari hama.

B. Variable Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian yang pertama adalah ekstrak etanol 96% dilanjutkan dengan fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun ungu.

Variable utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun ungu terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan data diulang oleh peneliti lain secara cepat. Sedangkan variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini.

2.1. Variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanolik daun ungu dengan berbagai konsentrasi.

2.2. Variabel kendali. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923, kondisi laboratorium (antara lain: kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian, tempat tumbuh tanaman, waktu panen dan metode ekstraksi.

2.3. Variabel tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun ungu.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun ungu adalah daun segar yang sudah dikeringkan dan diambil dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah (tepatnya di B2P2TOOT).

Kedua, serbuk daun ungu adalah daun ungu yang dikeringkan, setelah kering dibuat serbuk dan diayak menggunakan ayakan nomer 40.

Ketiga, ekstrak adalah hasil ekstraksi daun ungu dengan larutan penyari etanol 96% menggunakan metode maserasi kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan dilanjutkan dengan fraksinasi.

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

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

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

Ketujuh, bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *S. aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

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

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ungu sebagai bahan utama. Reagen mikrob: bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, medium *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mueller Hinton Agar* (MHA), larutan Kristal violet (Gram A), lugol iodine (Gram B), etanol 70% - aseton = 1 : 1 (Gram C), safranin (Gram D), minyak imersi, asam sitrat, larutan H₂O₂ 3%, kalium telurit 1%, Mc Farland 0,5%. Reagen kimia: etanol 96%, *n*-heksana, etil asetat, aquadest steril, FeCl₃, H₂SO₄ pekat, CH₃COOH, larutan mayer, serbuk magnesium, DMSO 5%.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain botol maserasi, mikroskop, objek glass, dekk glass, erlenmeyer, lampu spiritus, tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, pipet mikro (50 µl), gelas beker, inkas, jarum ose, pinset, alat penyerbuk, ayakan no 40, oven, seperangkat alat rotasi evaporator, *sterling-bidwell*, plat KLT, detector sinar UV 254 mm dan 366 nm, autoklav, batang pengaduk, timbangan analitis, cawan petri, cawan penguap, corong pemisah, kain flannel, kertas saring, corong penyaring, aluminium foil.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman ungu

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi daun ungu. Determinasi daun ungu ini dimaksudkan untuk menetapkan sampel yang digunakan untuk penelitian. Determinasi harus dicocokkan pula dengan pustaka yang dibuktikan di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Pembuatan serbuk daun ungu

Daun ungu yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) berupa simplisia yang telah

dikeringkan, setelah itu diserbuk menggunakan alat penyerbuk dan diayak menggunakan ayakan no. 40.

3. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air serbuk daun ungu dilakukan menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Metode ini dilakukan dengan cara menimbang serbuk daun ungu 20 gram dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xylen sampai serbuk terendam kemudian memasang alat *Sterling Bidwell*. Panaskan labu dengan hati-hati, dipanaskan dengan api kecil setelah mendidih api dibesarkan. Pemanasan dihentikan jika pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes. Kemudian diukur kadar airnya dengan menggunakan alat *Sterling Bidwell* dengan melihat volume pada skala alat tersebut (Kementerian Kesehatan RI 2013).

4. Pembuatan ekstrak daun ungu

Pembuatan maserasi kecuali dinyatakan lain, dilakukan sebagai berikut: 500 gram serbuk daun ungu dimasukkan ke dalam sebuah bejana atau botol kaca gelap, dituangi 75 bagian cairan penyari (3,75 liter etanol 96%) kemudian ditutup, dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, kemudian diserukai dan diperas, ampas dicuci dengan 25 bagian cairan penyari (1,25 liter etanol 96%), sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Pindahkan ke dalam bejana tertutup, biarkan di tempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40°C sehingga menjadi ekstrak kental daun ungu.

5. Fraksinasi ekstrak daun ungu

Ekstrak etanol daun ungu sebanyak 10 gram disuspensikan dengan etanol : aquadest (1:1) sebanyak 75 ml kemudian dipartisi di corong pisah dengan *n*-heksan masing-masing 75 ml sebanyak 3 kali. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan evaporator suhu 40°C lalu ditimbang dan disebut sebagai fraksi *n*-heksan.

Residu dari fraksinasi *n*-heksan dipartisi dalam corong pisah lagi dengan menambahkan etil asetat masing-masing 75 ml sebanyak 3 kali. Hasil fraksinasi yang diperoleh dipekatkan dengan cara dengan evaporator suhu 40°C lalu ditimbang dan disebut sebagai fraksi etil asetat.

Residu dari fraksi etil asetat dipekatkan dengan waterbath suhu ± 50 °C lalu ditimbang dan disebut sebagai fraksi air.

6. Tes bebas etanolik daun ungu

Ekstrak daun ungu diuji etanolnya dengan melakukan uji esterifikasi etanol menggunakan H_2SO_4 pekat dan CH_3COOH kemudian dipanaskan, hasil uji bebas etanol dalam ekstrak daun ungu ditandai dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol (Depkes 1987).

7. Uji kandungan senyawa kimia serbuk, ekstrak, dan fraksi daun ungu

7.1. Saponin. Sebanyak 0,1 gram serbuk, ekstrak, dan fraksi masing-masing dilarutkan dengan air panas dalam tabung reaksi kemudian dikocok kuat-kuat selama ± 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil (Setyowati *et al* 2014).

7.2. Polifenol dan Tanin. Serbuk, ekstrak, dan fraksi ditimbang sebanyak masing-masing 0,1 gram dilarutkan 10 ml aquadest kemudian disaring dan filtrat ditambah 3 tetes $FeCl_3$ 1%. Hasil positif tanin ditunjukkan terbentuk warna hijau kehitaman (Setyowati *et al* 2014). Uji polifenol diperoleh hasil positif dengan menambah pereaksi $FeCl_3$ 1% membentuk warna larutan biru gelap (Robinson 1995).

7.3. Flavonoid. Serbuk, ekstrak, dan fraksi ditimbang sebanyak masing-masing 0,1 gram lalu dilarutkan dalam air panas dan menambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Hasil positif ditunjukkan warna jingga (Setyowati *et al* 2014).

7.4. Alkaloid. Serbuk, ekstrak, dan fraksi ditimbang sebanyak masing-masing 0,1 gram ditambah 1 ml HCl 2N dan 9 ml aquadest dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi 3 bagian, masing-masing ditambah pereaksi Mayer dan Dragendorff. Hasil positif ditunjukkan terbentuk endapan putih dan terbentuk jingga (Setyowati *et al* 2014).

7.5. Steroid. Sebanyak 0,1 gram bahan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan 0,5 ml asam asetat anhidrida. Selanjutnya campuran ditetesi dengan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Bila terbentuk warna hijau kebiruan atau hijau tua menunjukkan adanya steroid

dan bila terbentuk warna merah hijau atau violet-biru menunjukkan adanya terpenoid (Jones & Kinghorn 2006).

8. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang digunakan dalam praktikum harus dalam kondisi yang steril. Cawan petri, pipet, tabung reaksi, dan labu disterilkan dengan udara panas (oven). Alat penanam bakteri (ose) disterilkan dengan pembakaran, yaitu dengan membakarnya sampai membara dengan lampu spiritus. Media dan alat-alat gelas disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu mencapai 121°C selama 15 menit, tekanan 1-2 atm.

9. Identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

9.1 Identifikasi bakteri dengan cawan gores. Suspensi bakteri *S. aureus* ATCC 25923 diinokulasi pada media VJA yang telah ditetesi 3 tetes kalium telurit 1% dalam cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian yaitu beberapa koloni dengan warna hitam, karena *S. aureus* ATCC 25923 dapat mereduksi telurit menjadi metalik telurit di sekitar koloni yang berwarna hitam. Adanya *fenol red* maka medium di sekitar koloni berwarna kuning, hal ini disebabkan karena *S. aureus* ATCC 25923 dapat memfermentasi manitol (Jawetz *et al* 2007).

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

9.3 Identifikasi biokimia *S. aureus* ATCC 25923. Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri yang ditanam pada medium nutrient cair dengan H₂O₂ 3%. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara sebab *S. aureus* mempunyai enzim katalase. Penambahan H₂O₂ akan terurai menjadi H₂O. Hal ini ditandai dengan timbulnya gelembung udara (Jawetz *et al* 2007).

Uji koagulase dapat menggunakan plasma darah kelinci atau plasma darah manusia yang diberi asam sitrat, diencerkan (1:5) ditambah 1 ose biakan bakteri, diinkubasi pada suhu 37°C. tabung-tabung diperiksa dengan melihat pembentukan selama 1-4 jam. Hasilnya positif kuat jika tabung tes dibalik, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung (Jawetz *et al* 2007).

10. Pembuatan biakan dan suspensi bakteri

Bakteri uji diambil dari biakan murni kurang lebih 2 ose dan dimasukkan tabung yang telah diisi 10 ml media BHI. Kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standard Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Tujuan disesuaikan suspensi bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dengan standard Mc Farland 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

Tahap selanjutnya pembuatan suspensi untuk dilusi dilakukan dengan mengencerkan suspensi bakteri yang telah disesuaikan dengan standard Mc Farland 0,5 diencerkan dengan perbandingan 1:1000 pada sebuah tabung menggunakan BHI (Bonang & Koeswardono 1982).

11. Pengujian antibakteri daun ungu secara difusi

Sediaan ekstrak etanolik dan ketiga sediaan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun ungu diuji aktivitas antibakterinya terhadap *S. aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi. Larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dibuat masing-masing tiga konsentrasi yaitu 50 %, 25%, dan 12,5% menggunakan pelarut DMSO 5%. Bakteri uji diinokulasi pada media MHA 40 ml yang berada dalam cawan petri yang telah memadat dengan menggunakan kapas lidi steril yang telah dicelupkan dalam biakan bakteri. Kapas lidi diusapkan pada seluruh media hingga rata secara aseptis, kemudian didiamkan 10 menit agar suspensi biakan terdifusi ke media. Sebanyak 50 µl larutan stok ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dipipet dimasukkan dalam media yang dilubangi menggunakan boorprop yang telah disterilkan.

Larutan ekstrak dari semua konsentrasi kemudian diteteskan di atas media, sebagai kontrol positif diletakkan pula kertas cakram amoksisilin dan sebagai kontrol negatif, diletakkan pula kertas cakram yang telah ditetesi dengan DMSO

5%. Replikasi dilakukan tiga kali. Masa inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat yang terbentuk. Pengujian aktivitas antibakteri ditunjukkan pada gambar 6.

12. Pengujian antibakteri daun ungu secara dilusi

Metode dilusi dengan menggunakan 1 deretan tabung reaksi yang terdiri dari 12 tabung steril, 10 tabung steril digunakan sebagai seri pengenceran dan 2 tabung steril digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Tabung tersebut masing-masing mempunyai konsentrasi yang berbeda-beda yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,80%, 0,4%, 0,2%, 0,1%. Suspensi bakteri dalam medium BHI dimasukkan ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptis kecuali tabung pertama (kontrol negatif). Kontrol negatif berisi 1 mL bahan uji dan kontrol positif berisi 1 mL suspensi bakteri. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. KHM ditentukan dengan cara menentukan konsentrasi terendah larutan uji dari tabung yang jernih. Tabung yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Selanjutnya diamati ada atau tidaknya koloni berwarna hitam pada media selektif. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah dari ekstrak dan fraksi teraktif tidak ada koloni bakteri yang tumbuh pada media MHA. Pengujian aktivitas antibakteri ditunjukkan pada gambar 5.

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

Fraksi teraktif dari ekstrak etanolik daun ungu dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, kemudian totolkan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari sisi bawah lempeng KLT. Lapsi bak kromatografi dengan kertas saring. Bak kromatografi dijenuhkan dengan fase gerak yang sesuai, ditandai dengan kertas saring terbasahi semuanya. Setelah totolan kering, lempeng KLT dimasukkan ke dalam bak kromatografi yang sudah dijenuhkan, elusi dilakukan sampai jarak tertentu. Lempeng KLT diangkat dan diangin-anginkan hingga kering, kemudian deteksi noda di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm serta pereaksi tertentu.

Bercak yang terdeteksi kemudian ditentukan harga Rfnya dan penampakan warnanya.

13.1. Identifikasi saponin. Identifikasi adanya senyawa saponin dilakukan menggunakan KLT, fase diam silika gel GF 254 dan fase geraknya kloroform : etanol : air (65:35: 2). Dideteksi di bawah sinar UV 254 nm berwarna kuning dan di bawah sinar UV 366 nm berwarna hijau. Pereaksi semprot menggunakan anisaldehyd dengan hasil berwarna ungu dan di bawah bercak sinar biasa berwarna biru (Harbone 1987).

13.2. Identifikasi tanin. Identifikasi adanya senyawa tanin dilakukan menggunakan KLT, fase diam silika gel GF 254 dan fase geraknya menggunakan *n*-heksan : etil asetat (3:7). Pereaksi semprot yang digunakan FeCl_3 1 %. Dideteksi di bawah sinar UV 366 nm berwarna hitam (Saputri 2014).

13.3. Identifikasi flavonoid. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254 dengan fase gerak etil asetat : *n*-heksan (1:3) (Haeria 2013). Pereaksi penampak sitroborat. Flavonoid akan berfluoresensi pada sinar UV 366 nm. Hasil positif jika terbentuk fluoresensi kuning, biru, dan ungu pada UV 366 nm (Harborne 1987).

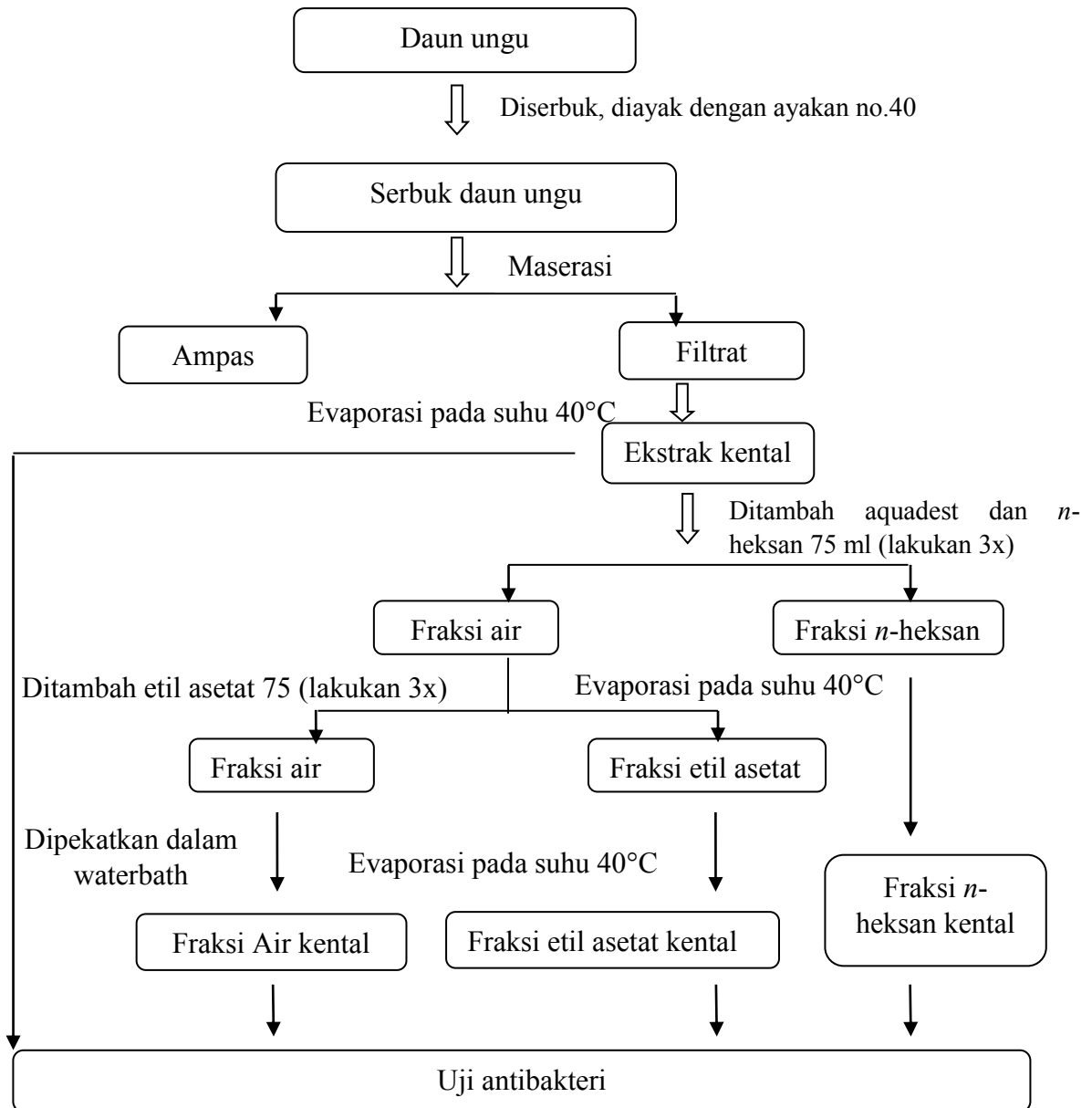
13.4. Identifikasi alkaloid. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254 dengan fase gerak yang digunakan etil asetat : etanol : air (90:9:1) dengan pereaksi semprot Dragendrof. Senyawa alkaloid akan terlihat bercak jingga sampai merah tua setelah disemprot sengan pereaksi Dragendrof. Alkaloid akan menunjukkan peredaman pada sinar UV 254 nm dan beberapa alkaloid akan berfluoresensi kuning atau biru (Harborne 1987).

13.5. Identifikasi steroid. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254 dengan fase gerak yang digunakan *n*-heksan : etil asetat (1:9) (Ismarti 2011), dengan penyemprot Lieberman Burchard. Robinson (1995) menyebutkan bahwa warna biru yang muncul diakibatkan oleh adanya reaksi Lieberman-Burchard pada senyawa terpenoid dan steroid, bila sterol dan triterpena alkohol dicampur dengan anhidrat asetat dan setetes asam sulfat pekat maka akan dihasilkan warna biru.

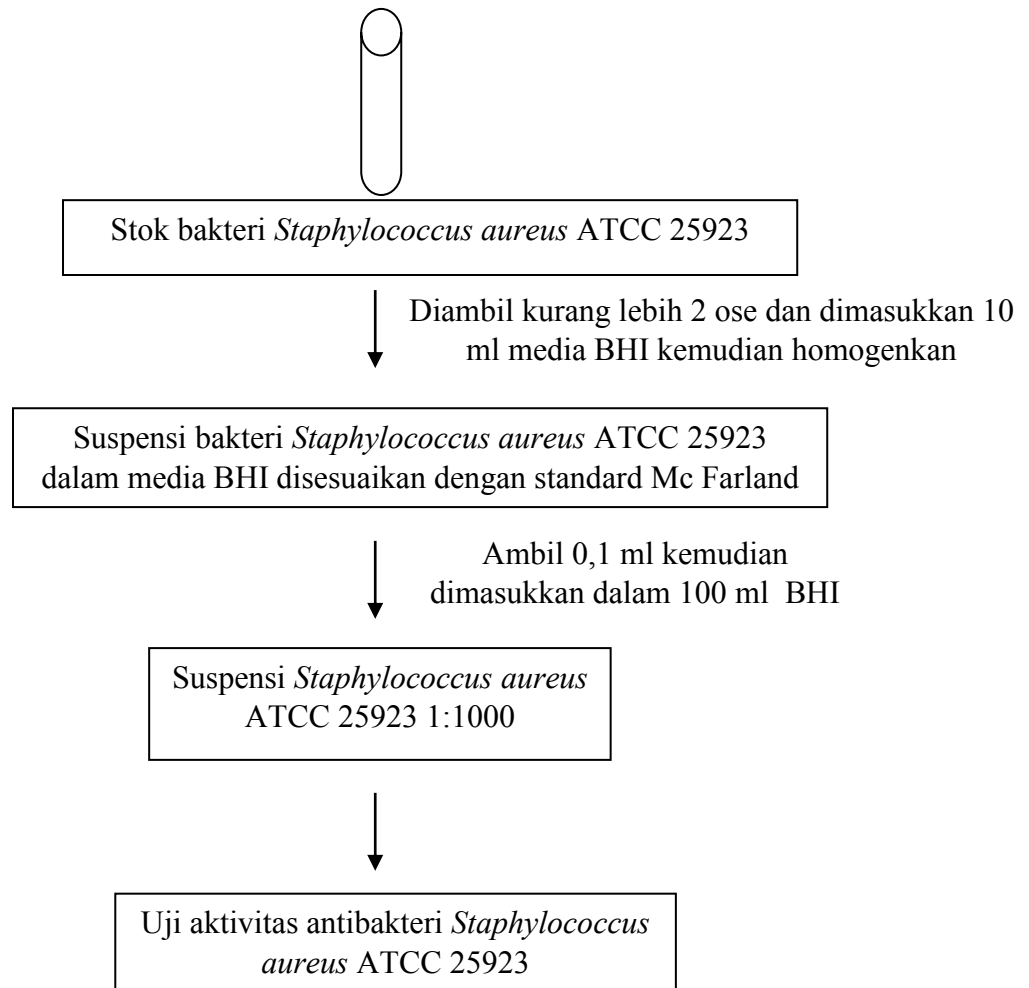
E. Analisis Data

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun ungu terhadap *S. aureus* menggunakan metode difusi yang dinyatakan dengan nilai zona hambat yang terbentuk. Hasil data yang diperoleh dianalisis menggunakan SPSS. Analisis statistik yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji distribusi normal (Kolmogorov-Smirnov), jika data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan metode uji non parametrik, sedangkan jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA). Uji dilanjutkan dengan Post Hoc test untuk melihat apakah terdapat perbedaan diantara masing-masing perlakuan.

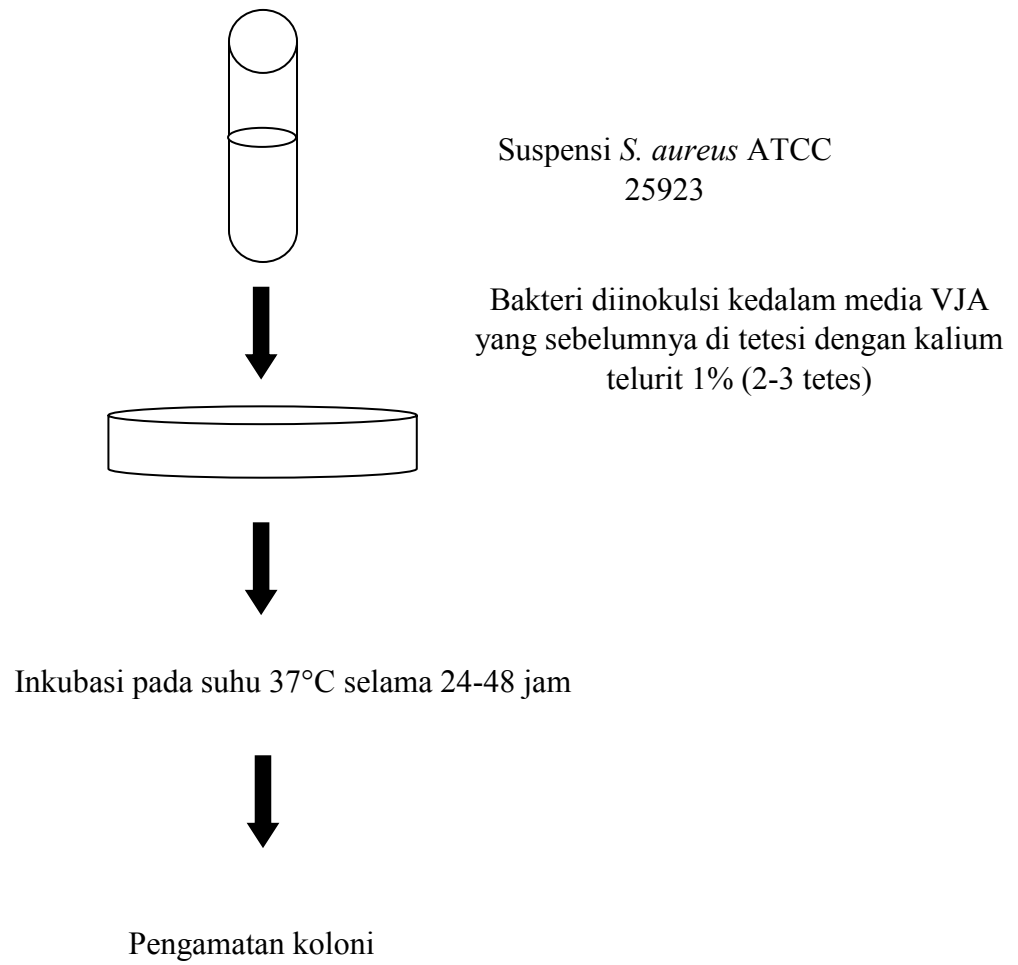
F. Skema Jalannya Penelitian



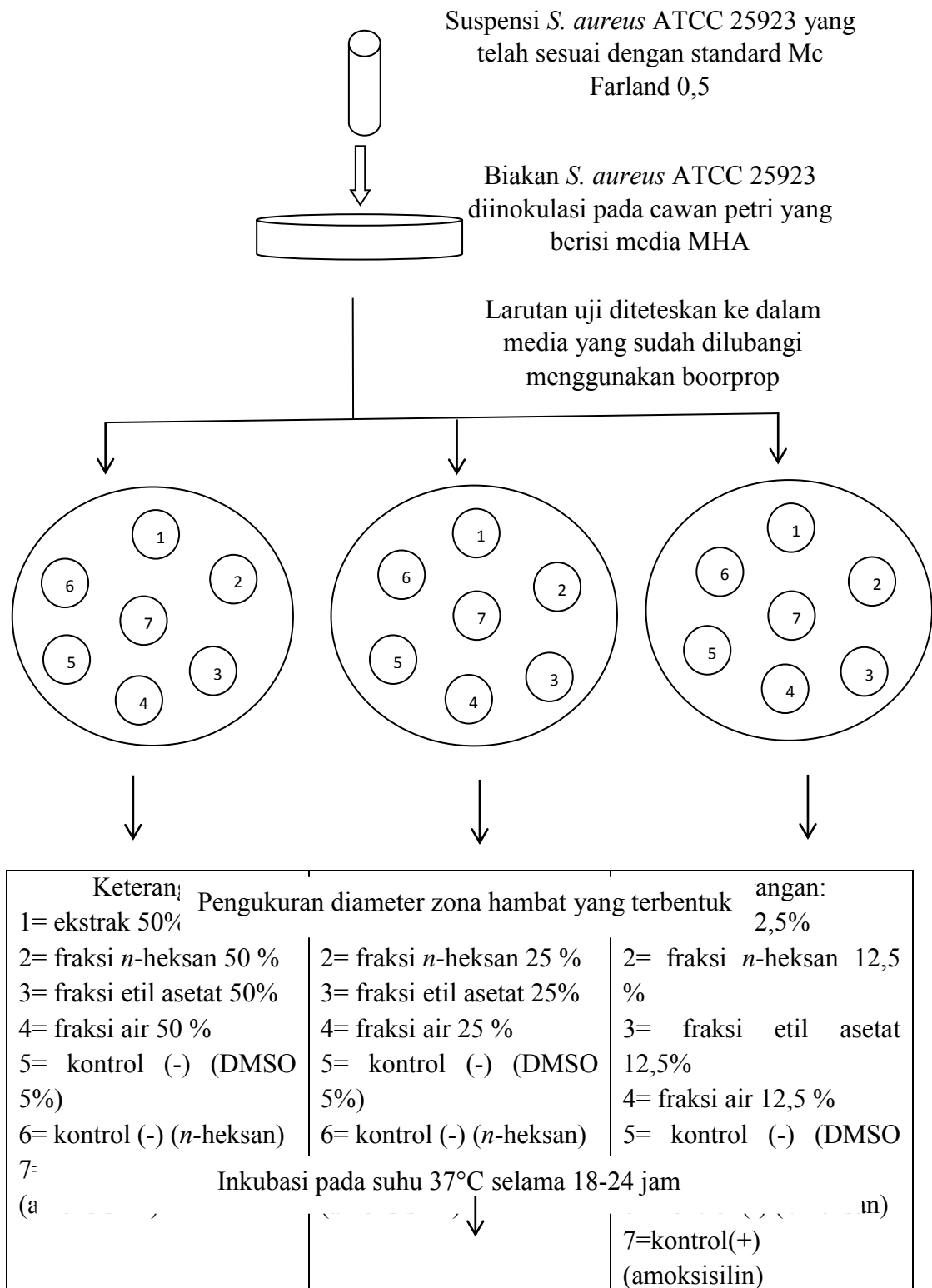
Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanolik dan fraksinasi daun ungu.



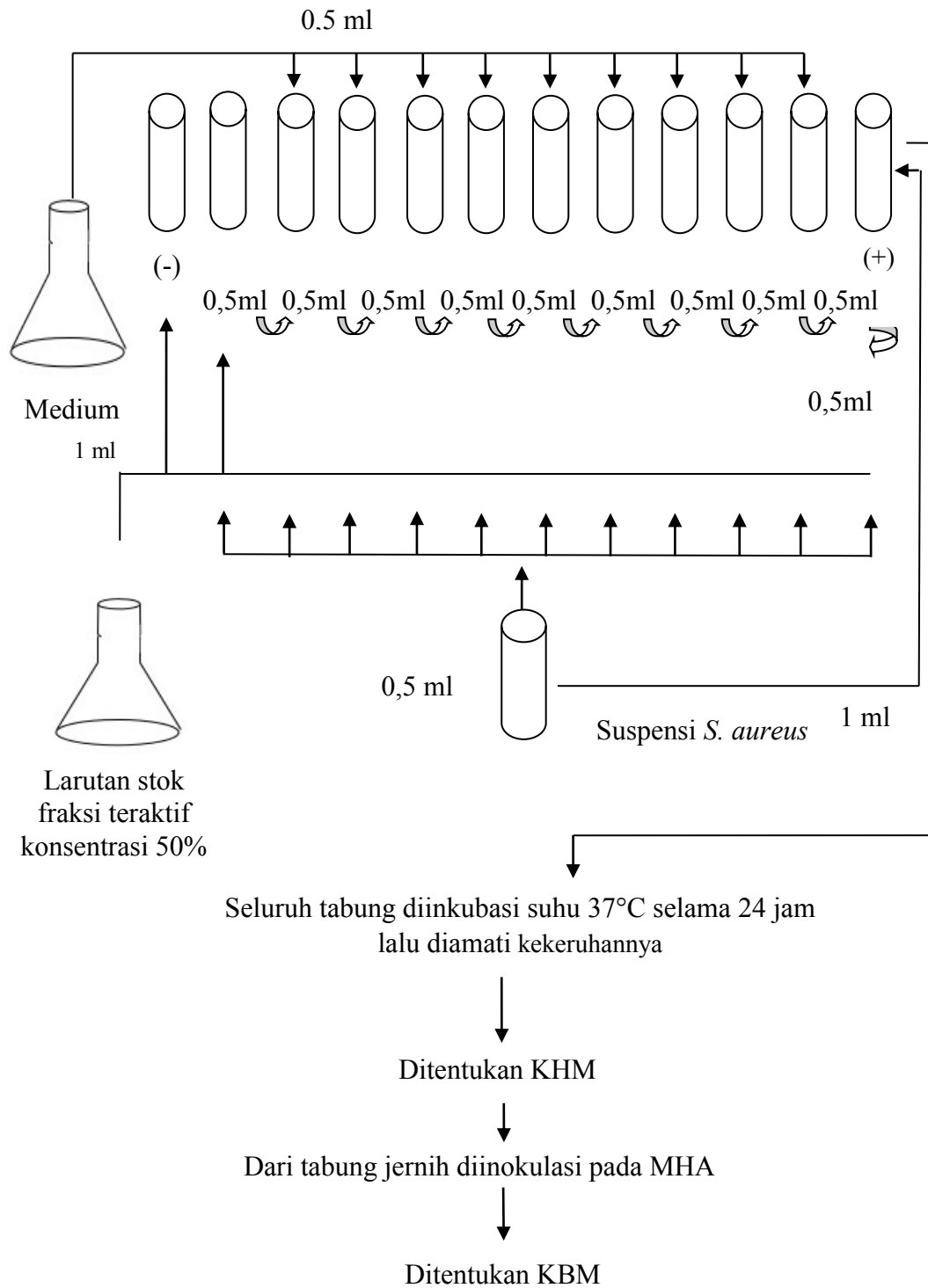
Gambar 4. Skema pembuatan suspensi bakteri uji 1:1000.



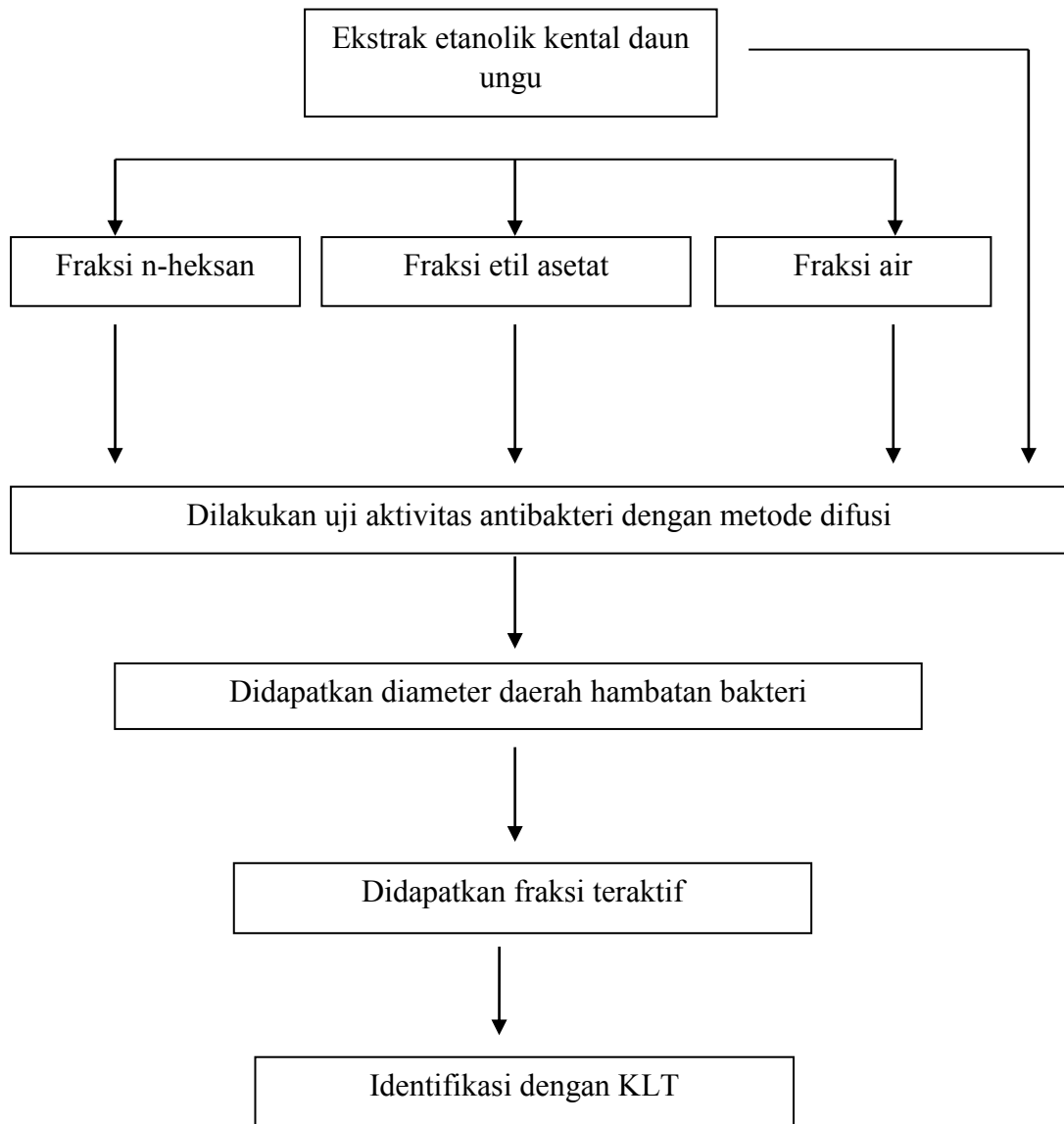
Gambar 5. Skema identifikasi bakteri secara makroskopis.



Gambar 6. Skema pengujian aktivitas daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923 secara difusi.



Gambar 7. Skema pengujian aktivitas fraksi teraktif ekstrak daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923 secara dilusi.



Gambar 8. Skema penelitian.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff)

Determinasi tanaman merupakan langkah awal dalam suatu penelitian. Determinasi tanaman terlebih dahulu dilakukan untuk mengetahui identitas tanaman yang akan digunakan. Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ungu yang telah diidentifikasi di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Berdasarkan hasil determinasi tersebut dinyatakan benar bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff). Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pembuatan serbuk daun ungu

Daun ungu yang diperoleh dari B2P2TOOT berupa simplisia yang sudah dikeringkan dan dihitung bobot keringnya terhadap bobot basah daun ungu dapat dilihat pada table 2.

Tabel 2. Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah daun ungu

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (% b/b)
30000	3000	10

Bobot basah daun ungu sebesar 30 Kg dan diperoleh bobot kering daun ungu sebanyak 3 Kg sehingga persentase rendemen yang diperoleh adalah 10% b/b. Data perhitungan lengkap dapat dilihat pada lampiran 2.

3. Penetapan kadar air

Hasil dari penetapan kadar air serbuk daun ungu dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar air dengan menggunakan alat *Sterling Bidwell*

Replikasi	Penimbangan (gram)	Volume air (ml)	Kadar air (%)
1	20	1,8	9
2	20	1,6	8,2
3	20	1,6	8,2
Rata-rata			8,33

Penetapan kadar air bertujuan untuk memperoleh persentase kadar air yang terdapat pada serbuk yang akan diekstraksi. Hasil penetapan kadar air diperoleh rata-rata sebesar 8,83%. Hal ini menunjukkan bahwa kadar air dari serbuk daun ungu tidak beresiko karena belum melampaui batas 10%. Semakin tinggi kadar air maka kualitas bahan tersebut makin rendah. Kadar air harus dipertahankan serendah mungkin agar tidak melebihi 10% untuk mencegah pembusukan (Sahwan 2002). Kadar air yang tinggi pada serbuk juga dapat menyebabkan hasil yang tidak efektif pada pembuatan ekstrak dan pengujian aktivitas antibakteri dimana air merupakan media pertumbuhan yang baik bagi mikroorganisme yaitu membantu nutrisi masuk kedalam mikroorganisme (Rahmadani 2015). Perhitungan kadar air dan rangkaian alat *Sterling Bidwell* dapat dilihat pada lampiran 12 dan 3.

4. Pembuatan ekstrak daun ungu

Serbuk daun ungu diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi dipilih karena merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana dan peralatan yang digunakan juga cukup sederhana. Pemilihan metode maserasi dikarenakan senyawa flavonoid dalam daun ungu rentan terhadap panas sehingga tidak bagus menggunakan metode soxhletasi, hal ini dibuktikan ketika orientasi hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kental daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923 lebih bagus ketika menggunakan metode maserasi, kemungkinan dengan metode soxhletasi kadar flavonoidnya rendah dikarenakan adanya proses oksidasi. Suhu pada proses soxhletasi mempengaruhi jumlah fenolik yang ditarik. Semakin tinggi suhu ekstraksi, maka kelarutan senyawa fenolik semakin meningkat (Santos-Buelga

dan Williamson, 2003). Proses maserasi dimulai dengan merendam simplisia yang sudah dihaluskan menjadi serbuk dalam larutan penyari sampai meresap dan susunan sel akan melunak sehingga zat-zat yang mudah larut akan terlarut (Ansel 1989). Pelarut yang digunakan etanol 96% agar senyawa yang bersifat polar, semi polar, dan non polar dapat terlarut, ekstrak cair kemudian dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40°C. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun ungu dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil pembuatan ekstrak daun ungu secara maserasi

Berat serbuk (gram)	Hasil ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
500	72	14,4
1000	117,1	11,71
1000	120,3	12,03

Hasil penetapan ekstrak daun ungu dari proses maserasi dengan pelarut etanol 96% secara berturut-turut memiliki rendemen 14,4%, 11,71%, dan 12,03% b/b. Organoleptis ekstrak berwarna hijau pekat, bentuk kental, dan bau khas aromatik. Ekstrak kental kemudian difraksinasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan air. Perhitungan persentase rendemen dan proses maserasi dapat dilihat pada lampiran 13 dan 4.

5. Identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak, dan fraksi dari daun ungu

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan pada serbuk, ekstrak dan fraksi. Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam daun ungu. Hasil identifikasi serbuk dan ekstrak daun ungu seperti yang terlampir dalam penelitian dapat dilihat pada tabel 5 dan foto hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 5. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun ungu

Kandungan senyawa kimia	Serbuk	Ekstrak	Keterangan	
			Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl pekat : Jingga	Serbuk Mg + HCl pekat: jingga gelap	+	+
Steroid	Asam asetat anhidrida + H ₂ SO ₄ pekat : Hijau tua	Asam asetat anhidrida + H ₂ SO ₄ pekat : Hijau tua	+	+
Saponin	Penyabunan: Busa stabil	Penyabunan: Busa stabil	+	+
Tanin	FeCl ₃ 1% : Hijau kehitaman	FeCl ₃ 1% : Hijau tua	+	+
Alkaloid	Mayer : endapan putih Dragendorff : jingga	Mayer: endapan putih Dragendorff : jingga	+	+

Berdasarkan hasil yang tertera diatas identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak etanolik daun ungu menunjukkan bahwa serbuk dan ekstrak mengandung golongan senyawa flavonoid, steroid, saponin, tanin, dan alkaloid. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ini telah sesuai Arifatin 1999 yang menyatakan bahwa daun ungu mengandung senyawa saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, dan steroid.

Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dari fraksi dapat dilihat pada tabel 6. Fraksi yang dilakukan uji adalah semua hasil fraksi yaitu *n*-heksan, etil asetat dan air.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia fraksi daun ungu

Kandungan senyawa kimia	<i>n</i> -heksan	Hasil		<i>n</i> -heksan	Keterangan	
		Etil asetat	Air		Etil asetat	Air
Flavonoid	Hijau tua	Terbentuk warna jingga	Hijau tua	-	+	-
Steroid	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	Jingga	+	+	-
Saponin	Tidak timbul busa	Tidak timbul busa	Timbul busa	-	-	+
Tanin	Hijau muda	Coklat kemerahan	Hijau kehitaman	-	-	+
Alkaloid	Mayer: endapan hijau	Mayer : endapan putih	Mayer: endapan jingga	-	+	-
	Dragendorff: endapan hijau	Dragendorff: jingga	Dragendorff : jingga	-	+	+

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa pada fraksi *n*-heksan mengandung senyawa steroid, pada fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan

steroid, dan pada fraksi air senyawa yang terkandung di dalamnya adalah saponin, tanin, dan alkaloid pada uji dragendorff.

6. Uji bebas etanolik ekstrak daun ungu

Uji bebas etanol dilakukan dengan tes esterifikasi etanol ekstrak daun ungu. Hasil tes esterifikasi etanol dalam ekstrak daun ungu dapat dilihat pada tabel 6

Tabel 7. Hasil tes bebas etanol ekstrak daun ungu

Prosedur	Hasil	Pustaka
Ekstrak + H ₂ SO ₄ conc + CH ₃ COOH dipanaskan	Tidak tercium bau ester yang khas etanol	Tidak tercium bau ester yang khas etanol

Hasil uji tes bebas etanol menunjukkan bahwa ekstrak daun ungu sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 96% yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas. Uji bebas etanol bertujuan agar pada ekstrak tidak terdapat etanol yang memiliki aktivitas antibakteri, sehingga tidak mengganggu aktivitas antibakteri dari ekstrak daun ungu.

7. Fraksinasi daun ungu

Hasil ekstrak etanolik daun ungu kemudian dilakukan fraksinasi. Tujuan dilakukan fraksinasi adalah untuk memisahkan golongan senyawa berdasarkan perbedaan polaritasnya. Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi penelitian ini adalah *n*-heksan, etil asetat dan air. *n*-heksan merupakan pelarut yang bersifat non polar, etil asetat bersifat semi polar dan air bersifat polar. Senyawa non polar akan terekstraksi dalam pelarut *n*-heksan, senyawa semipolar akan terekstraksi dalam pelarut etil asetat, dan senyawa polar akan terekstraksi dalam pelarut air, maka akan mudah memperkirakan bahan aktif yang dapat digunakan sebagai antibakteri dalam masing-masing fraksi (Harborne 2006).

Ekstrak difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan dan air, kemudian fraksi *n*-heksan yang didapat dipekatkan. Residu fraksi air dilanjutkan dengan ekstraksi cair-cair pelarut semi polar (etil asetat), kemudian fraksi etil asetat yang diperoleh dipekatkan. Residu yang diperoleh dipekatkan sehingga didapatkan fraksi air.

Fraksinasi menggunakan *n*-heksan dan etil asetat dilakukan replikasi sebanyak 3 kali agar senyawa yang terkandung dalam ekstrak dapat benar-benar tertarik

dalam masing-masing pelarut. Hasil dari fraksi *n*-heksan dan etil asetat terletak diatas sedangkan fraksi air terletak dibawah, hal ini dikarenakan air memiliki berat jenis yang lebih besar dibanding *n*-heksan dan etil asetat. Hasil fraksinasi daun ungu dapat dilihat pada tabel 8. Perhitungan rendemen fraksi dapat dilihat pada lampiran 14.

Tabel 8. Perolehan fraksi dari ekstrak daun ungu

Fraksi	Bobot ekstrak (gram)	Bobot fraksi (gram)	Rendemen (%)
<i>n</i> -heksan	340,86	121,490	35,64
Etil asetat	340,86	14,191	4,163
Air	340,86	139,684	40,97

Persentase rendemen yang didapat dari masing-masing fraksi berbeda-beda, hal ini disebabkan karena adanya perbedaan kemampuan penyari dari masing-masing pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi. Persentase rendemen dari fraksi air lebih besar dibanding etil asetat dan *n*-heksan, sedangkan fraksi *n*-heksan lebih besar dari pada fraksi etil asetat. Dari tabel di atas dapat diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam daun ungu lebih banyak mengandung senyawa yang bersifat polar. Total persen rendemen yang hilang adalah 19,23%, kemungkinan dikarenakan sebagian senyawa menguap bersama pelarut pada proses fraksinasi, masih ada yang menepel pada dinding corong pisah dan gelas penampung, serta adanya sebagian pengotor yang dibuang. Organoleptis dari fraksi *n*-heksan dan etil asetat berwarna berwarna hijau tua dan fraksi air berwarna coklat.

8. Identifikasi *S. aureus* ATCC 25923

8.1 Hasil identifikasi koloni *S. aureus* ATCC 25923. Hasil identifikasi koloni *S. aureus* ATCC 25923 menunjukkan koloni berwarna hitam, karena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat mereduksi tellurit menjadi metalik tellurit dan warna media disekitar koloni berwarna kuning karena adanya fermentasi manitol yang dideteksi oleh perubahan warna indikator phenol red dari merah menjadi kuning (asam), dimana dalam kondisi asam menghasilkan pigmen yang bervariasi dari putih sampai kuning tua (Jawetz *et al* 2012). Berdasarkan identifikasi makroskopis yang dilakukan menunjukkan hasil positif yang dibuktikan dengan adanya warna koloni hitam dan warna medium disekitar koloni menjadi kuning. Hasil identifikasi koloni dapat dilihat pada lampiran 7.

8.2 Hasil identifikasi mikroskopis *S. aureus* ATCC 25923 dengan pewarnaan Gram. Hasil pengamatan dengan melakukan pewarnaan Gram pada mikroskop perbesaran kuat (100x) sel tampak berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur. Bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) memiliki dinding peptidoglikan yang lebih tebal dari pada Gram negatif, sehingga pada pengecatan Gram *S. aureus* dapat mempertahankan warna violet dari Gram A (kristal violet). Tujuan pewarnaan Gram ialah untuk melihat morfologi bakteri dan bentuk sel. Perbedaan respon terhadap mekanisme pewarnaan Gram didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif mengandung protein dalam prevalensi lebih rendah dan dinding selnya tebal. Pemberian kristal violet dan iodine, pemberian etanol pada pewarnaan Gram menyebabkan tidak terestrasinya lipid sehingga memperkecil permeabilitas dinding sel Gram positif. Dinding selnya terdehidrasi dengan perlakuan alkohol, pori-pori mengerut, daya rembes dinding sel dan membran menurun sehingga pewarnaan safranin tidak dapat masuk sehingga sel berwarna ungu (Pelezar dan Chan 1988). Hasil gambar identifikasi secara mikroskopis dapat dilihat pada lampiran 7.

8.3 Hasil identifikasi biokimia *S. aureus* ATCC 25923. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada medium nutrisi cair dengan H₂O₂ 3%. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara sebab *S.*

aureus mempunyai enzim katalase. Katalase adalah enzim yang berperan pada daya tahan bakteri terhadap proses fagositosis (Susilowati 2014). Hasil dari uji katalase yaitu terlihat adanya gelembung udara (katalase positif), hal ini dikarenakan H_2O_2 bersifat toksik bagi bakteri, sehingga bakteri akan menghasilkan enzim katalase untuk menetralkan H_2O_2 menjadi O_2 dan H_2O . Uji ini dilakukan untuk membedakan antara *S. aureus* dan *Streptococcus*. Hasil gambar identifikasi fisiologi berdasarkan katalase dapat dilihat pada lampiran 7.

Uji koagulase menggunakan plasma darah kelinci yang diberi asam sitrat diencerkan (1:5), dimana asam sitrat mampu menggumpalkan plasma akibat adanya suatu faktor yang terdapat dalam serum. Faktor serum bereaksi dengan koagulase untuk membentuk esterase dan aktivitas penggumpalan, serta untuk mengaktifkan protrombin menjadi trombin. Trombin akan membentuk fibrin yang akan berpengaruh terhadap terjadinya penggumpalan plasma. Enzim koagulase dapat menghambat fagositosis (Susilowati 2014). Hasil positif kuat jika tabung tes dibalik atau dimiringkan, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung. Hasil identifikasi pada penelitian ini menunjukkan positif terjadi perubahan plasma darah kelinci. Tes koagulase ini digunakan untuk membedakan antara bakteri *S. aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*, karena *Staphylococcus epidermidis* tidak membentuk gumpalan-gumpalan putih. Hasil gambar identifikasi secara koagulase atau biokimia dapat dilihat pada lampiran 7.

9. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun ungu secara difusi

Fraksi yang didapatkan dari ekstrak daun ungu yaitu fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air yang kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 25923. Larutan stok fraksi dibuat dalam tiga konsentrasi yaitu 50% v/v, 25% v/v, dan 12,5% v/v. Pelarut yang digunakan untuk masing-masing konsentrasi menggunakan DMSO 5% karena DMSO 5% tidak menunjukkan adanya zona bening pada uji diameter zona hambat. DMSO memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi di atas 5% (Khumar et al 2008). Pustaka lain menyebutkan bahwa konsentrasi DMSO kurang dari 2% tidak efektif, sedangkan

apabila konsentrasi DMSO lebih dari 12% akan menyebabkan toksik bagi mikroba (Day & Brand 2005). Untuk melarutkan fraksi *n*-heksan digunakan juga *n*-heksan hal ini dikarenakan *n*-heksan tidak menunjukkan adanya diameter zona bening pada bakteri *S. aureus* ATCC 25923, sehingga pada penelitian ini digunakan 2 kontrol negatif yaitu DMSO 5% dan *n*-heksan.

Kontrol positif yang digunakan adalah amoksisilin karena amoksisilin merupakan antibiotik golongan penisilin berspektrum luas. Amoksisilin dapat berfungsi sebagai antibakteri karena dapat menghambat tahap akhir sintesis dinding sel bakteri. Amoksisilin dapat menghambat enzim transpeptidase dengan cara mengikat enzim melalui ikatan kovalen sehingga mencegah pembentukan dinding sel bakteri. Akibatnya dinding sel menjadi lemah dan karena adanya tekanan turgor dari dalam, dinding sel akan pecah atau lisis sehingga bakteri mati (Siswandono & Soekardjo 2000). Selain itu, amoksisilin merupakan pengasilasi kuat, dimana reaksi asilasi menyebabkan kekuatan dinding sel bakteri menjadi lemah dan mudah terjadi lisis sehingga bakteri mengalami kematian (Jawetz et al 2007).

Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dilakukan dengan metode difusi dengan waktu inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Daya antibakteri dari setiap ekstrak dan fraksi dapat dilihat dari ada tidaknya zona hambat disekitar lubang/sumuran yang ditandai dengan adanya daerah jernih yang diukur dalam satuan milimeter (mm), yang kemudian dibandingkan dengan kontrol positif yaitu amoksisilin. Hasil diameter hambat uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada tabel 12.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi pada fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak daun ungu memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 25923, ditunjukkan dengan adanya zona bening pada konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5%. Ekstrak dikatakan berpotensi sebagai antimikroba jika pada kadar pemberian $\leq 100\%$ mampu menghambat pertumbuhan antimikroba (Mitscher et al 1992).

Antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif adalah amoksisilin. Dapat dilihat bahwa rata-rata zona hambat yang dihasilkan amoksisilin adalah 23,44 mm

sehingga dapat dikatakan bahwa amoksisilin mempunyai aktivitas antibakteri yang *susceptible* terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923. Berdasarkan *Table Zona Diameter Interpretive Standards (mm)* amoksisilin dikatakan resisten jika menghasilkan diameter hambat ≤ 19 mm. Kepekaan bakteri dikatakan resisten (R) jika luas zona hambatan 0-13 mm, intermediate (I) jika luas zona hambatan 14-17 mm, dan dikatakan sensitive (S) jika luas zona hambatan diatas 18 mm (Faisal *et al* 2015). Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat konsentrasi 50% adalah intermediate terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dengan rata-rata zona hambat 17,11 mm.

Tabel 9. Hasil diameter daya hambat pada uji antibakteri dari daun ungu secara difusi terhadap *S. aureus* ATCC 25923

Sediaan uji	Konsentrasi	Diameter hambat (mm)			Rata-rata \pm SD
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	50%	13,33	13,00	12,66	12,99 \pm 0,335
	25%	12,66	12,33	11,00	11,99 \pm 0,878
	12,5%	9,33	9,00	9,00	9,11 \pm 0,190
Fraksi <i>n</i> -Heksan	50%	11,66	11,33	11,00	11,33 \pm 0,330
	25%	11,33	10,00	9,66	10,33 \pm 0,882
	12,5%	8,33	8,66	8,00	8,33 \pm 0,330
Fraksi Etil asetat	50%	17,33	17,33	16,66	17,11 \pm 0,223
	25%	15,00	16,33	14,66	15,33 \pm 0,882
	12,5%	13,66	12,00	12,33	12,66 \pm 0,878
Fraksi Air	50%	13,00	13,00	12,33	12,77 \pm 0,386
	25%	12,66	11,33	11,00	11,66 \pm 0,878
	12,5%	8,66	7,33	8,00	7,99 \pm 0,665
Amoksisilin	25 μ g	21,33	23,44	23,44	22,73 \pm 1,218
DMSO	5%	0	0	0	0 \pm 0,000
<i>n</i> -Heksaan		0	0	0	0 \pm 0,000

Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif karena memiliki zona hambat paling besar terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dibandingkan fraksi *n*-heksan dan air. Hal ini disebabkan pada fraksi etil asetat mampu menarik senyawa semi polar seperti flavonoid dan steroid yang memiliki aktivitas antibakteri lebih baik atau potensial dibandingkan senyawa lain yang terkandung pada fraksi *n*-heksan maupun air. Fraksi *n*-heksan aktivitas antibakterinya lebih rendah dibandingkan fraksi etil asetat, kemungkinan karena

senyawa steroid tidak lebih baik dibandingkan senyawa flavonoid, steroid dan alkaloid yang terkandung dalam fraksi etil asetat sehingga aktivitas antibakteri lebih dipengaruhi oleh senyawa flavonoid. Fraksi air aktivitas antibakterinya lebih rendah dari fraksi etil asetat, dan lebih tinggi dibandingkan fraksi *n*-heksan kemungkinan disebabkan karena senyawa saponin, alkaloid, dan tanin yang terkandung dalam fraksi air, sehingga aktivitas antibakterinya lebih besar dari fraksi *n*-heksan. Fraksi etil asetat lebih aktif dibandingkan ekstrak kemungkinan karena di ekstrak terdapat banyak senyawa-senyawa lain yang tidak mampu bekerja dengan baik sehingga aktivitas antibakterinya lebih kecil (Anggraeni 2016).

Perhitungan statistik yang digunakan adalah anova *one way* untuk membandingkan ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun ungu pada masing-masing konsentrasi. Berdasarkan perhitungan *Kolmogorov-Smirnov* diperoleh signifikansi pada konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% berturut-turut adalah 0,268; 0,796; dan 0,270 yang berarti $> 0,05$ (H_0 diterima) sehingga dapat disimpulkan data pada masing-masing konsentrasi terdistribusi normal dan dapat dilakukan ANOVA *one way*.

Nilai probabilitas *Lavene Statistic* pada masing-masing konsentrasi yaitu 50%, 25%, dan 12,5% secara berturut-turut adalah 0,883; 1,00; 0,163 yang berarti $> 0,05$ maka H_0 diterima, atau perlakuan pada masing-masing konsentrasi telah homogen. Dari data uji ANOVA hasil signifikansi pada masing-masing konsentrasi $< 0,05$ yang berarti menunjukkan adanya perbedaan pada masing-masing perlakuan disetiap konsentrasi yang digunakan.

Uji *Tukey* pada konsentrasi 50% menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada *n*-heksan terhadap ekstrak, etil asetat, dan air. Selain itu pada etil asetat juga menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan terhadap ekstrak, *n*-heksan, dan air. Uji *Tukey* pada konsentrasi 25% menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada etil asetat terhadap ekstrak, *n*-heksan, dan air. Uji *Tukey* pada konsentrasi 12,5% juga menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada etil asetat terhadap ekstrak, *n*-heksan, dan air.

10. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun ungu dan amoksisilin secara dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif etil asetat dari daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dilakukan dengan metode dilusi untuk mencari KHM yaitu konsentrasi terendah obat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan KBM yaitu kadar obat terendah yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri. KBM dapat diketahui karena pada metode dilusi cair bahan uji lebih mudah berinteraksi dengan bakteri dan suspensi bakteri tersebar merata sehingga metode lebih peka.

Pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat daun ungu terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dengan konsentrasi larutan masing-masing 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,80%, 0,4%, 0,2%, 0,1%. Jumlah bakteri *S. aureus* ATCC 25923 yang digunakan disesuaikan kekeruhannya dengan standar *Mc Farland 0,5* dalam medium BHI mempunyai perbandingan pengenceran 1:1000 yang kemudian dicampur dengan fraksi etil asetat. Perhitungan konsentrasi larutan fraksi teraktif dapat dilihat pada lampiran 17 dan perhitungan konsentrasi amoksisilin dapat dilihat pada lampiran 18.

Nilai KHM pada penelitian ini tidak dapat ditentukan karena sampel fraksi yang digunakan berwarna gelap dan kekeruhannya tinggi sehingga mempersulit pengamatan. Inokulasi dari tabung pada medium MHA dalam cawan petri untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan bakteri *S. aureus* ATCC 25923 sehingga dapat diketahui KBM. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi dapat dilihat pada lampiran 9.

Tabel 10. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif etil asetat dan pembanding amoksisilin terhadap *S. aureus* ATCC 25923

No	Konsentrasi (%)	Fraksi etil asetat Replikasi			Konsentrasi (%)	Amoksisilin Replikasi		
		I	II	III		I	II	III
1	50	-	-	-	2,5	-	-	-
2	25	-	-	-	1,25	-	-	-
3	12,5	-	-	-	0,625	-	-	-
4	6,25	+	+	+	0,312	-	-	-
5	3,125	+	+	+	0,156	-	-	-
6	1,56	+	+	+	0,078	-	-	-
7	0,80	+	+	+	0,039	-	-	-
8	0,4	+	+	+	0,019	-	-	-
9	0,2	+	+	+	0,0097	-	-	-
10	0,1	+	+	+	0,0048	+	+	+

11	K (+)	+	+	+	K (+)	+	+	+
12	K (-)	-	-	-	K (-)	-	-	-

Keterangan:

(+) = terdapat pertumbuhan bakteri

(-) = tidak terdapat pertumbuhan bakteri

Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi menunjukkan bahwa pada tabung 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11 yang berisi BHI dan fraksi etil asetat dengan konsentrasi berturut-turut yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,80%, 0,4%, 0,2%, 0,1% serta pada tabung 1 berisi fraksi etil asetat dan tabung 12 berisi suspensi bakteri. Hasil pengujian antibakteri secara dilusi menunjukkan bahwa pada pada konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri hal ini menunjukkan bahwa makin besar konsentrasi dari fraksi etil asetat makin tinggi aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 25923.

Pembanding antibiotik amoksisilin dipilih karena amoksisilin merupakan antibakteri spektrum luas yang bersifat bakterisid dan efektif terhadap sebagian bakteri Gram positif dan beberapa Gram negatif patogen. Bakteri patogen yang sensitif terhadap amoksisilin salah satunya yaitu *S. aureus* (Amalia 2013).

Hasil penelitian membuktikan pada tabung ke-4 KBM dapat diketahui yaitu pada konsentrasi 12,5% yang merupakan kadar terendah fraksi etil asetat yang dapat membunuh bakteri *S. aureus* ATCC 25923. Hasil dilusi fraksi etil asetat terhadap *S. aureus* ATCC 25923 menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi fraksi etil asetat tidak dapat membunuh pertumbuhan bakteri.

KBM amoksisilin terhadap *S. aureus* ATCC 25923 adalah 0,0097%. Berdasarkan penelitian Setiawati 2015 amoksisilin dapat membunuh *S. aureus* pada konsentrasi 0,01 µg/ml. Hasil penelitan yang diperoleh menunjukkan bahwa amoksisilin dalam membunuh *S. aureus* ATCC 25923 lebih optimal dibandingkan fraksi etil asetat. Amoksisilin merupakan senyawa tunggal dan merupakan antibakteri berspektrum luas, sehingga kemungkinan potensi fraksi etil asetat dari daun ungu akan lebih lemah dibanding amoksisilin (Mardiana 2011).

11. Identifikasi fraksi teraktif etil asetat secara KLT

Analisis Kromatografi Lapis Tipis hanya dilakukan pada fraksi etil asetat karena fraksi ini mempunyai aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *S. aureus* ATCC 25923. Analisis ini dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi etil asetat yaitu senyawa flavonoid, dimana flavonoid merupakan senyawa paling aktif dari sampel yang digunakan pada penelitian ini.

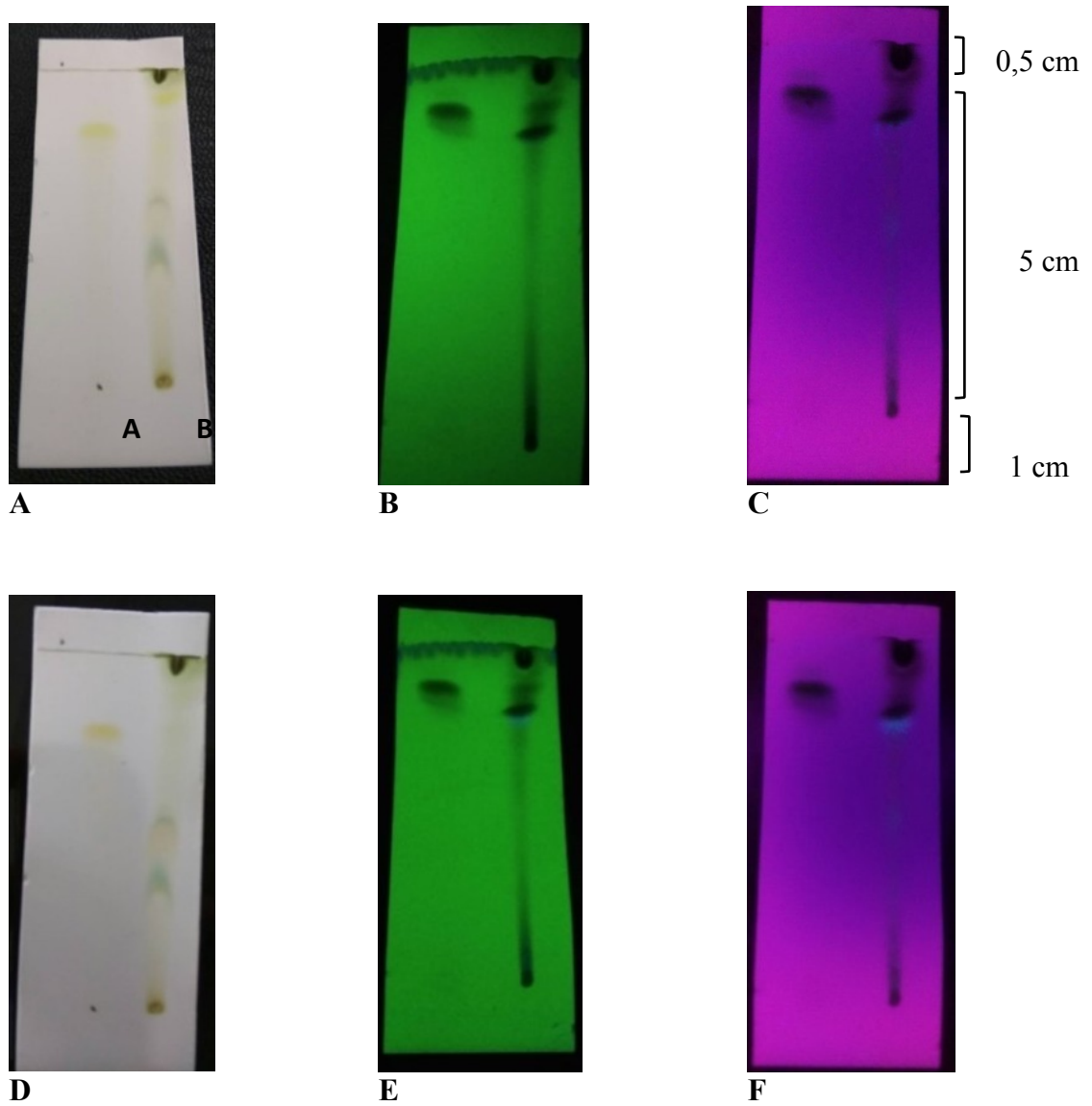
Identifikasi senyawa dilakukan dengan menggunakan fase gerak (eluen) dan penampak bercak yang sesuai dengan senyawa yang diuji. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF254 dan fase gerak etil asetat : *n*-heksan (1:3) ditambah 4 tetes asam formiat dengan pembanding quercetin. Penyemprot yang digunakan adalah siroborat. Hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid menghasilkan bercak setelah dideteksi pada sinar UV 254 nm terlihat peredaman fluoresensi diatas latar belakang hijau dan pada sinar UV 366 nm menunjukkan fluoresensi warna ungu dan pada sinar tampak menunjukkan adanya bercak berwarna kuning kecoklatan. Nilai Rf dari quercetin adalah 0,80 dan nilai Rf dari sampel adalah 0,78. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid secara KLT dinyatakan positif karena terdapat kesamaan hasil pengamatan dengan pustaka (Harborbe 1987). Hasil identifikasi flavonoid fraksi etil asetat dengan KLT dapat dilihat pada gambar 9.

Berdasarkan hasil identifikasi senyawa dengan KLT fraksi etil asetat dari ekstrak etanolik daun ungu memiliki kandungan senyawa flavonoid (quercetin). Mekanisme kerja antibakteri senyawa flavonoid yaitu dengan membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti keluarnya senyawa intraseluler (Ruban 2012). Flavonoid merupakan golongan fenol dan dapat membunuh bakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hydrogen. Terbentuknya senyawa kompleks menyebabkan terganggunya struktur tersier protein yang menyebabkan protein tidak dapat berfungsi lagi sehingga terjadi denaturasi pada protein dan asam nukleat (Azizah 2012). Aktivitas antibakteri quercetin mengikat sub unit GyrB DNA girase dan menghambat aktivitas enzim ATPase. Dalam quercetin menyebabkan peningkatan

permeabilitas membrane bakteri dan secara signifikan menghambat motilitas bakteri (Jannata *et al* 2014).

Tabel 11. Hasil identifikasi flavonoid fraksi etil asetat secara KLT

Sampel	Rf	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	Pereaksi Sitroborat	Pustaka (Harborne 1987)	Keterangan
quercetin	0,80	Meredam	Meredam	Kuning kecoklatam		+
Sampel	0,78	Meredam	Meredam	Kuning kecoklatan	Biru	+



Gambar 9. Profil kromatogram senyawa flavonoid, a) sinar tampak; b) UV 254 sebelum disemprot; c) UV 366 sebelum disemprot; d) sesudah disemprot sitroborat; e) UV 254 sesudah disemprot; f) UV 366 sesudah disemprot; A) standart quercetin; B) fraksi etil asetat

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, fraksi *n*-heksan, etil asetat, air, dan ekstrak etanol daun ungu memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 25923

Kedua, fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 25923, diameter hambatan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923 pada konsentrasi 50% adalah 17,11 mm.

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923 yaitu pada konsentrasi 12,5%.

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri fraksi daun ungu secara *in vivo*.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun ungu terhadap *S. aureus* ATCC 25923.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad SA. 1990. *Flavonoid dan Phytomedica, Kegunaan, dan Prospek*. Jakarta: Yayasan Pengembangan Obat Alam Hytomedika.
- Amalia KD. 2013. Isolasi, identifikasi dan uji sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap amoxicillin dari sampel susu kambing Peternakan Ettawa (PE) penderita mastitis di wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Kedokteran Hewan universitas Gadjah Mada.
- Anggraeni P. 2016. uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak metanolik daun kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Ansel HC. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Diterjemahkan oleh Farida Ibrahim, Asmanizar, Iis Aisyah. Edisi IV. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Arifatin LR. 1999. Kajian flavonoid daun *Graptophyllum pictum* Griff (daun wungu) sebagai analgesik dan antiinflamasi pada tikus (*Rattus Strain Wistar*) [Skripsi]. Malang: Jurusan Biologi FMIPA Unibraw.
- Azizah IN. 2012. daya antibakteri ekstrak daun ungu (*Graptophyllum pictum*) terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* [Skripsi]. Surabaya: Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga.
- Bassett J, Denney RC, Jeffery GH, Mendham J. 1994. *Buku Ajar Vogel: Kimia Analisis Kuantitatif Organik*. Ed 4. Jakarta: EGC. hlm 228-229.
- Bennett JE. 2006. Antimicrobial Agents: Antifungal Agents. *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapaeutics*. 11th Edition. New York: McGraw-Hill.
- Bonang, Koeswardono ES. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Unika Atmajaya, PT Gramedia. hlm 9, 77-78, 176-191.
- Cheeke PR. 2000. Actual and potential applications of *Yucca Schidigera* and *Quillaja Saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Proceedings of the American Society of Animal Science, American Society of Animal Science* 1-10.

- Cowan. 1999. *Plant Product as Antimicrobial Agents*, Clinical Microbiology Reviews. Department of Microbiology, Miami University, Oxford, Ohio 45056.
- Desfonda L, Djamil R. 2010. Isolasi dan identifikasi jenis senyawa flavonoid dalam fase *n*-butanol dari ekstrak etanol daun daruju (*Acanthus ilcifolius* Linn.) Makasar: Kongres Ilmiah XVIII IAI.
- [Depkes RI]. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI]. 1986. *Sediaan Galenika*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI]. 1987. *Analisis Obat Tradisional*. Jilid 1. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI]. 1995. *Materia Medika Indonesia*. Jilid VI. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI]. 2007. *Riset Kesehatan Dasar*. Edisi III. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Entjang I. 2003. *Mikrobiologi dan Parasitologi*. Bandung: PT Citra Aditya Bakti.
- Faisal M, Fatimawali, Wewengkang DS. 2015. Uji Kepekaan Bakteri Yang Diisolasi dan Diidentifikasi Dari Sputum Penderita Bronkhitis di RSUP Prof dr R. D. Kandou Manado terhadap Antibiotik Golongan Sefalosporin (Sefiksim), Penisilin (Amoksisilin), dan Tetrasiklin (Tetrasiklin). *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT* 4(3):88-95.
- Gan S, Setiabudi R, Syamsudin U, Bustami ZS. 1987. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Ganiswara SG. 2005. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi IV. Jakarta: Bagian farmakologi FKUI.
- Ganiswarna. 2009. *Farmakologi dan Terapan*. Edisi V (cetak ulang). Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Garrity GM, Liburn JR, Cole SH, Harrison J, Euzeby and BJ tindall. 2007. *Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea*, Release 7.7. Michigan: Michigan State University Board of Trustees. P. 364.464.
- Goodman A & gilman H. 2007. *Dasar Farmakologi Terapi*. Edisi 10. Volume 1. Jakarta: EGC. hlm 682-684.

- Haeria. 2013. Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Uji Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* L.) Griff). *Jurnal Farmasi FIK UINAM* 1(1)1-8.
- Handa SS, Suman Preet SK, Gennaro L, Dev Dutt R. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: ICS-UNIDO.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun dan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Kosasih P, Iwang S. Penerjemah; Sofia N, editor. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.
- Harborne JB. 2006. *Metode Fitokimia*. Edisi ke-2. Kosasih P, Iwang S. Penerjemah; Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.
- Hariana A. 2009. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya Seri 1*. Penebar Swadaya. hlm 158.
- Hastari R. 2012. Uji aktivitas antibakteri ekstrak pelepah dan batang tanaman pisang ambon (*Musa paradisiaca* (var.) Sapientum) terhadap *Staphylococcus aureus* [Karya Tulis Ilmiah]. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Heinrich M, Joanne B, Simon G, Elizabeth MW. 2005. *Farmakoterapi dan Fitoterapi*. Syarief ER, Cucu A, Ella E, Euis RF, penerjemah; Hadinata AH, editor. Penerbit Buku Kedokteran: EGC.
- Hermawan A. 2007. Pengaruh ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan metode difusi disk [Artikel]. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Ismarti. 2011. Isolasi triterpenoid dan uji antioksidan dari fraksi etil asetat kulit batang meranti merah. [Artikel]. Program Studi Kimia Pascasarjana Universitas Andalas.
- Jannata RH, Gunadi A, Ermawati T. 2014. Daya ANtibakteri Ekstrak Kulit Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *e-Journal Pustaka Kesehatan* 2(1): 23-28.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Diterjemahkan oleh Dokter Bonang H. Edisi XVI.
- Jawetz E, JL Melnick, EA Adelberg, GF Brooks, JS Butel, LN Ornston. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi ke-23. Nugroho, Maulany RF, penerjemah; Jakarta: Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*.

- Jawetz E, JL Melnick, EA Adelberg. 2012. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*, diterjemahkan oleh Bonang G. Edisi XXIV. ECG. Penerbit: Universitas Indonesia, Jakarta. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*. 26rd Ed.
- Jones WP dan Kinghorn AD. 2006. *Extraction of Plant Secondary Metabolites*. In: Sarker SD, Latif Z dan Garry AI, penerjemah; New Jersey: Humana Press. Terjemahan dar : *Natural Products Isolation* 2nd Ed.
- [Kementerian Kesehatan RI]. 2011. *100 Top Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia – Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional. hlm 96-97.
- [Kementerian Kesehatan RI]. 2013. *Suplemen III Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi I. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. hlm 100-101.
- Khumaida N, NN Kristina, D Sartiami, TL Mardiningsih. 2008. *Kearifan lokal penduduk Jawa Barat, Maluku dan Papua dalam memanfaatkan tanaman obat handeuleum (Graptophyllum pictum (L.) Griff)*. Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia (TOI) XXXV. Serpong, 13-14 November 2008. hlm 284-290.
- Khumar CS, VL Dronamraju, Sarada, Rengasamy R. 2008. Seaweed Extract Control the leaf Spot Disease of The Medical Plant *Gymnema sylvestre*. *Indian Journal of Science and Technolgt* 1(13).
- Lenny S. 2006. *Senyawa Flavanoida, Fenilpropanida dan Alkaloida* [Karya Tulis Ilmiah]. Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Madduluri, Suresh R, Babu K, Sitaram B. 2013. In vitro evaluation of antibacterial activity of five indigenous plants extract against five bacterial pathogens of human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(4):679-684.
- Mardiana RN. 2011. uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) terhadap *Bacillus cereus* dan *pseudomonas aeruginosa* [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret.
- Mitscher LA, Ryey P, Bathala MS, Wu-wu-Nan D, Roger. 1992. *Antimicrobial Agents From Higher Plants: Introduction, Rational, and Methodology*.
- Mursyidi A. 1990. *Analisis Metabolit Sekunder*. Yogyakarta : Pusat Antar Universitas Bioteknologi Universitas Gajah Mada.

- Nugraheni R, Suhartono, Sri W. 2012. Infeksi Nosokomial di RSUD Kabupaten Wonosobo. *Media Kesehatan Masyarakat Indonesia* 11(1):94-100.
- Pelczar M.J. dan Chan, E.C.S. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jilid 2. Penerjemah Ratna Siri hadioetomo, dkk. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Pratiwi ST. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Penerbit Airlangga.
- Proboseno S. 2011. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun wungu (*Graptophyllum Pictum* (L) Griff) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* [Abstrak]. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Puspawati NM, Putu PS, Wiwik SR. 2015. Identifikasi dan uji aktivitas senyawa tanin dari ekstrak daun tremebesi (*Samanea saman* (Jacq.) Merr) sebagai antibakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia* 9(1) : 27-34.
- Radji M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Rahmadani F. 2015. uji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 96% kulit batang kayu jawa (*Lannea coromandelica*) terhadap bakteri *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *helicobacter pylori*, *pseudomonas aeruginosa* [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Hidayatullah.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Kosasih Padmawinata, penerjemah; Bandung: Institut Teknologi Bandung. Terjemahan dari: *The Organic Constituents of Higher Plants*.
- Ruban P, Gajalakshmi K. 2012. In vitro antibacterial activity of hibiscus *Rosa-Sinensis* L. flower extract against human pathogens. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(5):399-403.
- Sahwan AD. 2002. *Pakan Ikan dan Udang*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Santos-Buelga, Williamson CG. 2003. *Methods in Polyphenol Analysis*. Royal Society of Chemistry. Great Britain.
- Saputri IK. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kelapa sawit (*Elais guineensis jacq*) dan fraksi-fraksinya terhadap *Pseudomonas aeruginosa* serta profil KLTnya [Skripsi]. Surakarta : Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.

- Septiani G, Slamet BP, Sutrisno A. 2013. Potensi antibakteri ekstrak daun jeruju (*Achantus ilcifolius*) terhadap *Vibrio harveyi* secara in vitro. *Jurnal Kedokteran Hewan* 7(1):17-20.
- Sarker D, Satyajit, Latif Z, Gray IA. 2005. *Natural Products Isolation*. 2nd Ed. Humana Press. New Jersey: 283-285.
- Setiawati A. 2015. Peningkatan Resistensi Kultur Bakteri *Staphylococcus aureus* Terhadap Amoksisilin Menggunakan Metode Adaptif Gradual. *Jurnal Farmasi Indonesia* 7(3)190-194.
- Setyowati WA, Sri RDA, Ashadi, Bakti Mulyani, Cici PR. 2014. Skrining fitokimia dan identifikasi komponen utama ekstrak metanol kulit kayu durian (*Durio zibethinus* Murr.) varietas petruk. *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan VI*. hlm 271-280.
- Siswandono dan Soekardjo B. 2000. *Kimia Medisinal 1*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Soediro I, Isnawati A. 2003. Pemeriksaan Senyawa-senyawa Turunan Fenol Daun Handeleum (*Graphtophyllum pictum* (L.) Griff). *Media Litbang Kesehatan* 12(1):1-5.
- Stahl E. 1985. *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Kosasih Padmaeinata dan Iwang Sudiro, penerjemah; Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Sumarno. 2000. *Kromatografi Teori Dasar*. Yogyakarta: Bagian Kimia Farmasi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.
- Suriawiria U. 1986. *Mikrobiologi Air Dasar-Dasar Pengolahan Buangan Secara Biologi*. Cetakan 1. Bandung: Penerbit Alumni.
- Suryono DR Bambang. 1995. *Bakteriologi Umum dan Bakteriologi Klinik*. Kediri: AAK Bhakti Wiyata.
- Susilowati AB. 2014. pengaruh getah tanaman jarak pagar (*Jatropha curca* L) terhadap daya hambat bakteri *staphylococcus aureus* secara in vitro [Skripsi]. Makasar: Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hasanuddin.
- Tiwari P, Bimlesh K, Mandeep K, Gurpreet K, Harleen K. 2011. Skrining fitokimia dan ekstraksi. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 7:98-106.
- Todar K. 2005. *Salmonella and Salmonellosis*. *Todar's online Textbook pf Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison. Departemen of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/salmonella.html>. 15 September 2007.

- Voigt R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi V. Noerono S, penerjemah; Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Terjemahan dari: *Pharmaceutical Technology*.
- Waluyo L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Edisi II. Malang: Universitas Muhamadiyah Press.
- Warsa UC. 1993. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Binarupa Aksara. hlm 103-124.
- Wijayakusuma HM, S Dalimartha, dan A.S. Wirian. 1996. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*. Jilid 4. Pustaka Kartini. hlm 166.

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

DETERMINASI

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


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

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

Pertelaan:

Perawakan semak atau perdu, tegak, tinggi mencapai 3 meter. Batang berkayu, cabang bersudut tumpul, berbentuk galah dengan berbuku-buku nyata. Daun tunggal, letak bersilang dan berhadapan, bentuk helaian bulat memanjang atau lanset, pangkal segitiga terbalik (pasak), ujung meruncing, tepi bergelombang, panjang helaian daun 8-20 cm, lebar 3-13 cm, warna daun ungu kehijauan, ungu bercak hijau, ungu bercak putih, atau hijau, panjang tangkai daun $\frac{1}{2}$ -1 cm. Bunga majemuk bentuk malai, letak di ujung cabang, panjang tangkai bunga $\frac{1}{2}$ - $\frac{3}{4}$ cm, kelopak berbagi 5, panjang 3 mm, segmen sempit, tabung mahkota melebar di bagian ujung, panjang 2-3 cm, segmen 5, warna merah tua.

Tawangmangu, November 2016
 Penanggungjawab Determinasi,



Dyah Subositi, M.Sc
 NIP. 198308152006042003

Lampiran 2. Tanaman, simplisia, dan serbuk daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff)



Tanaman daun ungu



Simplisia daun ungu



Serbuk daun ungu

Lampiran 3. *Sterling-bidwell*, Inkubator dan *vacuum evaporator*



Sterling-bidwell









Inkubator

vacuum evaporator

Lampiran 4. Foto maserasi dan fraksinasi

Maserasi

Fraksi air dan <i>n</i> -heksan	 Replikasi 1	 Replikasi 2	 Replikasi 3
Fraksi air dan etil asetat	 Replikasi 1	 Replikasi 2	 Replikasi 3

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



Ekstrak daun ungu



Fraksi *n*-heksan






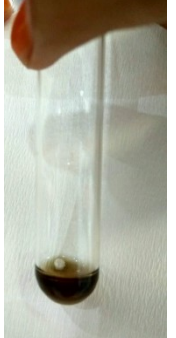




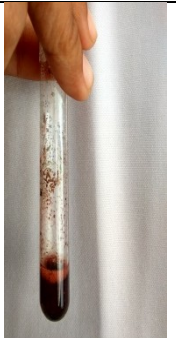


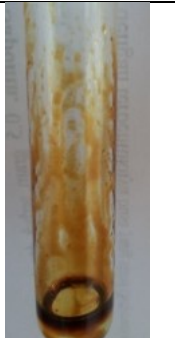









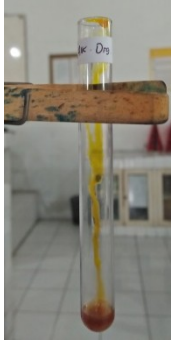

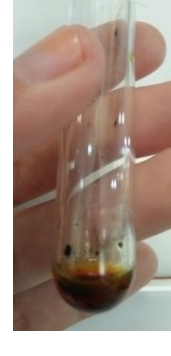
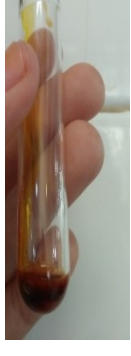


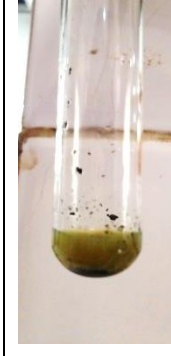


Fraksi Air



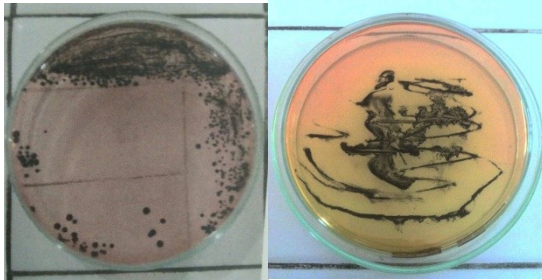
Fraksi etil asetat

Lampiran 6. Foto hasil uji kandungan senyawa serbuk, ekstrak dan fraksi

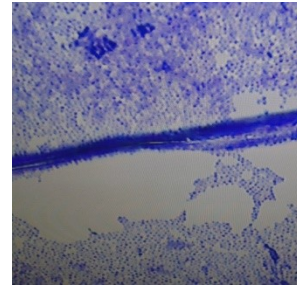
Senyawa	Serbuk	Ekstrak	Fraksi		
			<i>n</i> -heksan	Etil asetat	Air
Saponin					
Tanin					
Flavonoid					
Steroid					

Alkaloid (dragendorff)					
Alkaoid (mayer)					

Lampiran 7. Hasil identifikasi koloni, uji biokimia, dan identifikasi mikroskopis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Identifikasi koloni
Staphylococcus aureus ATCC
25923, koloni berwarna hitam.



Identifikasi dengan pewarnaan
gram, berwarna ungu, berbentuk
bulat dan bergerombol seperti
buah anggur

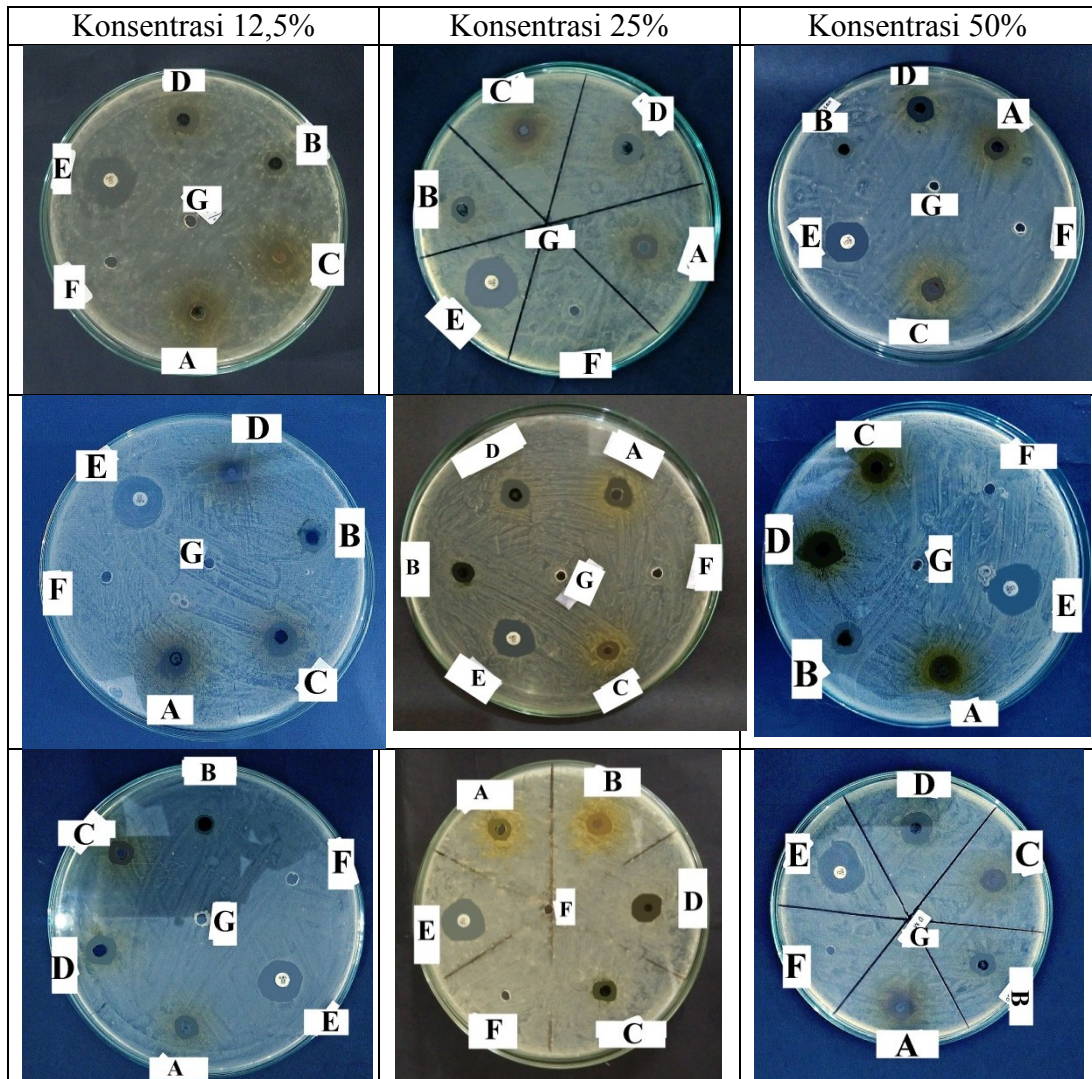


Uji koagulase, gumpalan plasma
tidak terlepas dan tetap melekat
pada dinding tabung



Uji katalase, timbul gelembung
udara.

Lampiran 8. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi dan ekstrak daun ungu terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara difusi



Keterangan:

- | | | | |
|---|---------------------------|---|--------------------|
| A | → ekstrak | E | → Amoksisilin |
| B | → fraksi <i>n</i> -heksan | F | → <i>n</i> -heksan |
| C | → fraksi air | G | → DMSO 5% |
| D | → fraksi etil asetat | | |

Lampiran 9. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun ungu terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara dilusi



Foto hasil inokulasi fraksi etil asetat terhadap <i>S. aureus</i> ATCC 25923 yang ditanam pada media <i>Mueller Hinton Agar</i>	
Replikasi 1	
Replikasi 2	
Replikasi 3	

Lampiran 10. Hasil uji aktivitas antibakteri amoksisilin dan inokulasi amoksisilin terhadap *S. aureus* ATCC 25923

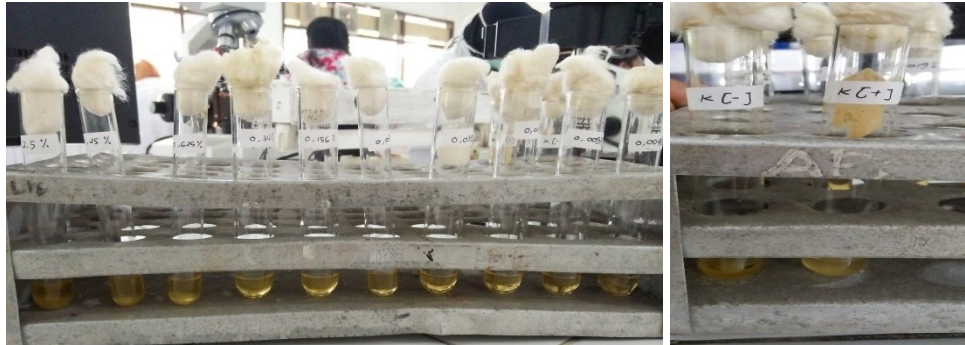


Foto hasil inokulasi amoksisilin terhadap <i>S. aureus</i> ATCC 25923 yang ditanam pada media Vogel Jhonson Agar	
Replikasi 1	
Replikasi 2	
Replikasi 3	

Lampiran 11. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (%)
30000	3000	30

Pehitungan bobot kering terhadap bobot basah sebagai berikut :

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

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{3000}{30000} \times 100\% = 30\%$$

Perhitungan *Lost On Dryinng* (LOD%) pengeringan daun ungu basah :

$$\text{LOD(\%)} = \frac{\text{bobot basah} - \text{bobot kering}}{\text{bobot basah}} \times 100\%$$

$$\text{LOD(\%)} = \frac{30000 - 3000}{30000} \times 100\% = 90 \%$$

Hasil perhitungan bobot kering terhadap bobot basah diperoleh rendemen sebesar 30% dan perhitungan *Lost On Drying* (LOD%) pengeringan daun ungu basah diperoleh sebesar 90%.

Lampiran 12. Perhitungan penetapan kadar air serbuk daun ungu

Replikasi	Penimbangan (gram)	Volume air (ml)	Kadar air (%)
1	20	1,8	9
2	20	1,6	8,2
3	20	1,6	8,2
Rata-rata			8,33

Data tersebut dianalisis dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Persentase kadar air} = \frac{\text{volume air terbaca}}{\text{berat bahan}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar air I} = \frac{1,8}{20} \times 100\% = 9 \%$$

$$\text{Kadar air II} = \frac{1,6}{20} \times 100\% = 8,2 \%$$

$$\text{Kadar air III} = \frac{1,6}{20} \times 100\% = 8,2 \%$$

Hasil penetapan kadar air dengan alat *Sterling Bidwell* menunjukkan tidak ada penyimpangan dan mempunyai rata-rata kadar air yaitu 8,33%.

Lampiran 13. Penetapan persen rendemen ekstrak etanolik daun ungu

Maserasi	Berat serbuk (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
1	500	72	14,4
2	1000	117,1	11,71
3	1000	120,3	12,03

Data tersebut dianalisis dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Persen rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat serbuk}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\%$$

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

$$\text{Rendemen II} = \frac{117,1}{1000} \times 100\% = 11,71 \%$$

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

Lampiran 14. Perhitungan rendemen fraksi etil asetat, *n*-heksan, dan air dari ekstrak etanolik daun ungu (*Graphtophyllum pictum* (L.) Griff)

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

Data tersebut dianalisis dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Persen rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat fraksi}} \times 100\%$$

$$\text{Fraksi etil asetat} = \frac{14,191}{340,86} \times 100\% = 4,163 \%$$

$$\text{Fraksi } n\text{-heksan} = \frac{121,490}{340,86} \times 100\% = 35,64 \%$$

$$\text{Fraksi air} = \frac{139,648}{340,86} \times 100\% = 40,97 \%$$

Lampiran 15. Perhitungan nilai Rf analisa Kromatografi Lapis Tipis dari senyawa flavonoid

Perhitungan Rf dihitung menggunakan rumus :

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

$$\text{Nilai Rf senyawa Flavonoid} = \frac{3,9}{5} = 0,78$$

$$\text{Nilai Rf Standar baku senyawa Quercetin} = \frac{4}{5} = 0,8$$

Lampiran 16. Pembuatan seri konsentrasi larutan uji metode difusi

Pembuatan seri konsentrasi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun ungu.

1. Konsentrasi 50%

Menimbang 1 gram ekstrak dilarutkan dengan DMSO 5% 2 ml

2. Konsentrasi 25%

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

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

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

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

Dipipet 0,5 ml dai sediaan awal (50%), kemudian ditambah DMSO 1% ad 1 ml

3. Konsentraasi 12,5%

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

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

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

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

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

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

Lampiran 17. Perhitungan konsentrasi fraksi etil asetat secara dilusi

Fraksi etil asetat daun ungu

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

Tabel perhitungan seri konsentrasi fraksi etil asetat metode dilusi

No	Konsentrasi (%)	V1	N1	V2	N2	Keterangan
1	50	-	-	-	-	1 ml larutan stok
2	50	-	-	-	-	1 ml larutan stok
3	25	0,5	50	1	25	0,5 ml tab. 2 + BHI ad 1 ml
4	12,5	0,5	25	1	12,5	0,5 ml tab. 3 + BHI ad 1 ml
5	6,25	0,5	12,5	1	6,25	0,5 ml tab. 4 + BHI ad 1 ml
6	3,125	0,5	6,25	1	3,125	0,5 ml tab. 5 + BHI ad 1 ml
7	1,56	0,5	3,125	1	1,56	0,5 ml tab. 6 + BHI ad 1 ml
8	0,78	0,5	1,56	1	0,78	0,5 ml tab. 7 + BHI ad 1 ml
9	0,39	0,5	0,78	1	0,39	0,5 ml tab. 8 + BHI ad 1 ml
10	0,19	0,5	0,39	1	0,19	0,5 ml tab. 9 + BHI ad 1 ml
11	0,09	0,5	0,19	1	0,09	0,5 ml tab. 10 + BHI ad 1 ml
12	-	-	-	-	-	1 ml suspensi jamur

Keterangan :

Tabung 1 = kontrol negatif

Tabung 3 = konsentrasi 25%

$V1 \cdot N1 = V2 \cdot N2$

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

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

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

Tabung 12 = kontrol positif suspensi bakteri 1 ml

Tabung 2 - 11 ditambah 0,5 ml suspensi bakteri

Lampiran 18. Pembuatan konsentrasi dan dilusi amoksisilin

Dosis amoksisilin : 125 mg/5 ml = 25 mg/ml.

: 2,5 g/100 ml = 2,5% b/v.

Konsentrasi 1 : 2,5 g/100 ml = 2,5%

Konsentrasi 2 : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

0,5 x 2,5% = 1 x C_2

$C_2 = 1,25\%$

Konsentrasi 3 : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

0,5 x 1,25% = 1 x C_2

$C_2 = 0,625\%$

Konsentrasi 4 : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

0,5 0,625% = 1 x C_2

$C_2 = 0,312\%$

Konsentrasi 5 : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

0,5 x 0,312% = 1 x C_2

$C_2 = 0,156\%$

Konsentrasi 6 : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

0,5 x 0,156% = 1 x C_2

$C_2 = 0,078\%$

Konsentrasi 7 : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

0,5 x 0,078% = 1 x C_2

$C_2 = 0,039\%$

Konsentrasi 8 : $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

0,5 x 0,039% = 1 x C_2

$C_2 = 0,019\%$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi 9} & : V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & 0,5 \times 0,019\% = 1 \times C_2 \\ & C_2 = 0,0097\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi 10} & : V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \\ & 0,5 \times 0,0097\% = 1 \times C_2 \\ & C_2 = 0,0048\%\end{aligned}$$

Kontrol negatif (-) berisi 1 ml antibiotik amoksisilin

Kontrol positif (+) berisi 1 ml suspensi bakteri.

Lampiran 19. Analisa data uji Anova antara ekstrak, fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dengan konsentrasi 50% dan 25% pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

a. konsentrasi 50%

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
diameter	12	13.5525	2.26612	11.00	17.33

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		diameter
N		12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	13.5525
	Std. Deviation	2.26612
Most Extreme Differences	Absolute	.289
	Positive	.289
	Negative	-.165
Kolmogorov-Smirnov Z		1.001
Asymp. Sig. (2-tailed)		.268

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

diameter

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ekstrak 50%	3	12.9967	.33501	.19342	12.1644	13.8289	12.66	13.33
n-heksan 50%	3	11.3300	.33000	.19053	10.5102	12.1498	11.00	11.66
etil asetat 50%	3	17.1067	.38682	.22333	16.1457	18.0676	16.66	17.33
air 50%	3	12.7767	.38682	.22333	11.8157	13.7376	12.33	13.00
Total	12	13.5525	2.26612	.65417	12.1127	14.9923	11.00	17.33

Test of Homogeneity of Variances

diameter

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.215	3	8	.883

ANOVA

Diameter

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	55.447	3	18.482	142.064	.000
Within Groups	1.041	8	.130		
Total	56.488	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

diameter

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak 50%	n-heksan 50%	1.66667 [*]	.29451	.002	.7236	2.6098
	etil asetat 50%	-4.11000 [*]	.29451	.000	-5.0531	-3.1669
	air 50%	.22000	.29451	.875	-.7231	1.1631
n-heksan 50%	ekstrak 50%	-1.66667 [*]	.29451	.002	-2.6098	-.7236
	etil asetat 50%	-5.77667 [*]	.29451	.000	-6.7198	-4.8336
	air 50%	-1.44667 [*]	.29451	.005	-2.3898	-.5036
etil asetat 50%	ekstrak 50%	4.11000 [*]	.29451	.000	3.1669	5.0531
	n-heksan 50%	5.77667 [*]	.29451	.000	4.8336	6.7198
	air 50%	4.33000 [*]	.29451	.000	3.3869	5.2731
air 50%	ekstrak 50%	-.22000	.29451	.875	-1.1631	.7231
	n-heksan 50%	1.44667 [*]	.29451	.005	.5036	2.3898
	etil asetat 50%	-4.33000 [*]	.29451	.000	-5.2731	-3.3869

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

Homogeneous Subsets

Diameter

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
n-heksan 50%	3	11.3300		
air 50%	3		12.7767	
ekstrak 50%	3		12.9967	
etil asetat 50%	3			17.1067
Sig.		1.000	.875	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

b. Konsentrasi 25%

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
diameter	12	12.3300	2.06422	9.66	16.33

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		diameter
N		12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	12.3300
	Std. Deviation	2.06422
Most Extreme Differences	Absolute	.186
	Positive	.186
	Negative	-.120
Kolmogorov-Smirnov Z		.646
Asymp. Sig. (2-tailed)		.798

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

diameter

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ekstrak 25%	3	11.9967	.87877	.50736	9.8137	14.1796	11.00	12.66
n-heksan 25%	3	10.3300	.88255	.50954	8.1376	12.5224	9.66	11.33
etil asetat 25%	3	15.3300	.88255	.50954	13.1376	17.5224	14.66	16.33
air 25%	3	11.6633	.87877	.50736	9.4804	13.8463	11.00	12.66
Total	12	12.3300	2.06422	.59589	11.0185	13.6415	9.66	16.33

Test of Homogeneity of Variances

Diameter

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.000	3	8	1.000

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

diameter

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak 25%	n-heksan 25%	1.66667	.71906	.173	-.6360	3.9693
	etil asetat 25%	-3.33333*	.71906	.007	-5.6360	-1.0307
	air 25%	.33333	.71906	.965	-1.9693	2.6360
n-heksan 25%	ekstrak 25%	-1.66667	.71906	.173	-3.9693	.6360
	etil asetat 25%	-5.00000*	.71906	.001	-7.3027	-2.6973
	air 25%	-1.33333	.71906	.318	-3.6360	.9693
etil asetat 25%	ekstrak 25%	3.33333*	.71906	.007	1.0307	5.6360
	n-heksan 25%	5.00000*	.71906	.001	2.6973	7.3027
	air 25%	3.66667*	.71906	.004	1.3640	5.9693
air 25%	ekstrak 25%	-.33333	.71906	.965	-2.6360	1.9693
	n-heksan 25%	1.33333	.71906	.318	-.9693	3.6360
	etil asetat 25%	-3.66667*	.71906	.004	-5.9693	-1.3640

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

ANOVA

Diameter

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	40.667	3	13.556	17.478	.001
Within Groups	6.205	8	.776		
Total	46.871	11			

Homogeneous Subsets**Diameter**Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
n-heksan 25%	3	10.3300	
air 25%	3	11.6633	
ekstrak 25%	3	11.9967	
etil asetat 25%	3		15.3300
Sig.		.173	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

c. Konsentrasi 12,5%

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
diameter	12	9.5250	2.00170	7.33	13.66

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		diameter
N		12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	9.5250
	Std. Deviation	2.00170
Most Extreme Differences	Absolute	.289
	Positive	.289
	Negative	-.142
Kolmogorov-Smirnov Z		1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)		.270

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptives

diameter

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ekstrak 12,5%	3	9.1100	.19053	.11000	8.6367	9.5833	9.00	9.33
n-heksan 12,5%	3	8.3300	.33000	.19053	7.5102	9.1498	8.00	8.66
etil asetat 12,5%	3	12.6633	.87877	.50736	10.4804	14.8463	12.00	13.66
air 12,5%	3	7.9967	.66501	.38394	6.3447	9.6486	7.33	8.66
Total	12	9.5250	2.00170	.57784	8.2532	10.7968	7.33	13.66

Test of Homogeneity of Variances

diameter

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.222	3	8	.163

ANOVA

diameter

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	41.356	3	13.785	40.555	.000
Within Groups	2.719	8	.340		
Total	44.075	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

diameter

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ekstrak 12,5%	n-heksan 12,5%	.78000	.47604	.411	-.7444	2.3044
	etil asetat 12,5%	-3.55333*	.47604	.000	-5.0778	-2.0289
	air 12,5%	1.11333	.47604	.168	-.4111	2.6378
n-heksan 12,5%	ekstrak 12,5%	-.78000	.47604	.411	-2.3044	.7444
	etil asetat 12,5%	-4.33333*	.47604	.000	-5.8578	-2.8089
	air 12,5%	.33333	.47604	.894	-1.1911	1.8578
etil asetat 12,5%	ekstrak 12,5%	3.55333*	.47604	.000	2.0289	5.0778
	n-heksan 12,5%	4.33333*	.47604	.000	2.8089	5.8578
	air 12,5%	4.66667*	.47604	.000	3.1422	6.1911
air 12,5%	ekstrak 12,5%	-1.11333	.47604	.168	-2.6378	.4111
	n-heksan 12,5%	-.33333	.47604	.894	-1.8578	1.1911
	etil asetat 12,5%	-4.66667*	.47604	.000	-6.1911	-3.1422

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

Homogeneous Subsets

diameter

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
air 12,5%	3	7.9967	
n-heksan 12,5%	3	8.3300	
ekstrak 12,5%	3	9.1100	
etil asetat 12,5%	3		12.6633
Sig.		.168	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

Lampiran 20. Formulasi dan pembuatan media

1. Formulasi dan pembuatan Mueller Hinton Agar (MHA)

Beef, dehydrated infusion	300 g
Casien hydrolysate	17,5 g
Strach	1,5 g
Agar-Agar	17 g

Suspensikan 38 g bahan diatas dalam 1000 ml aquadest, panaskan sampai larut sempurna. Sterilisasi pada autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.

2. Formulasi dan pembuatan Brain Heart Infusion (BHI)

Brain infusion	12,5 g
Heart infusion	5 g
Fructose peptone	10 g
Glucose	2 g
Sodium chloride	5 g
di-sodium hydrogen phosphate	2,5 g

Suspensikan 37 g bahan diatas dalam 1000 ml aquadest, panaskan sampai larut sempurna. Sterilisasi pada autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.

3. Formulasi dan pembuatan Vogel Jhonson Agar (VJA)

Peptone from casein	10,0 gram
Yeast extract	5,0 gram
di-potasium hydrogen phosphate	10,0 gram
D(-)mannitol	10,0 gram
Lithium chloride	5,0 gram
Glycine	10,0 gram
Phenol red	0,025 gram
Agar	13,0 gram

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.