

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI N-HEKSANA, ETIL ASETAT,
DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SENTE (*Alocasia
macrorrhiza* (L.) G. Don) TERHADAP *Pseudomonas
aeruginosa* ATCC 27853**



Oleh:

Dita Sulistyaningrum

19133747A

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI N-HEKSANA, ETIL ASETAT
DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SENTE (*Alocasia
Macrorrhiza* (L.) G. Don) TERHADAP *Pseudomonas
aeruginosa* ATCC 27853**

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

Oleh:

Dita Sulistyaningrum

19133747A

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI N-HEKSANA, ETIL ASETAT,
DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SENTE (*Alocasia
macrorrhiza* (L.) G. Don) TERHADAP *Pseudomonas
aeruginosa* ATCC 27853**

Oleh:

Dita Sulistyaningrum

19133747A

Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada Tanggal : 8 Juni 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi Dekan,



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

Pembimbing Utama,

Fransiska Leviana, S.Farm., M.Sc., Apt.

Pembimbing Pendamping,

Dra. Nony Puspawati, M.Si.

Penguji :

1. Dra. Kartinah Wiryosoendjoyo, SU
2. Ilham Kuncahyo, M.Sc., Apt.
3. Yane Dila Keswara, S.Farm., M.Sc., Apt.
4. Fransiska Leviana, S.Farm., M.Sc., Apt.

HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

- ✓ *Tuhan Yang Maha Esa*
- ✓ *Bapak dan Ibu tersayang,
terimakasih atas segala pengorbanan,
kasih sayang dan do'a selama ini yang
menjadi semangat untukku.*
- ✓ *Teman – teman seperjuangan s1
Farmasi Universitas Setia Buudi*
- ✓ *Sahabat – sahabat ku FKK1-B*
- ✓ *Agama, Almamater, Bangsa dan
Negaraku tercinta.*

HALAMAN PERNYATAAN

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

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

Surakarta, 8 Juni 2017



Dita Sulistyaningrum

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena berkat rahmat dan hidayat-Nya lah terselesaikannya skripsi yang berjudul **“Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi n-Heksana, etil asetat dan Air dari Ekstrak Etanol Daun Sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853”**. Skripsi ini disusun untuk meraih gelar Sarjana Farmasi Universitas Setia Budi di Surakarta.

Penyusunan skripsi ini tentunya tidak lepas dari bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis berterimakasih kepada :

1. Ir. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam penyusunan skripsi ini.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.
3. Fransiska Leviana, S.Farm.,M.Sc.,Apt. selaku pembimbing utama yang telah memberikan pengarahan, motivasi dan bimbingan dalam penyusunan skripsi ini.
4. Dra. Nony Puspawati, M.Si., selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan pengarahan, motivasi, dan bimbingan dalam penyusunan skripsi ini.
5. Tim penguji yang telah meluangkan waktunya untuk dapat menguji penulis.
6. Bapak dan Ibu Dosen Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta yang telah memberikan ilmunya kepada penulis.
7. Kedua orangtua tercinta, ayahanda Pudji Harto dan ibunda Susriyah yang selalu memberikan do'a kasih sayang yang luar biasa, dukungan moril maupun materil dan nasihatnya yang tak akan pernah mampu penulis membalas itu semua. Penulis hanya bisa berdo'a kepada Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang agar kiranya dengan segala Kebenaran-Nya mengasihi dan melindungi ayahanda dan ibunda tercinta, melimpahkan rezeki, dan memberikan keselamatan di dunia dan di akhirat kelak. *Aminn.*

8. Adikku yang tersayang Anisa Nova Puspitaningrum, kakek dan nenek ku serta saudara – saudara ku yang selalu memberikan semangat dan keceriaan dalam hidup penulis.
9. Teman – teman seperjuangan Farmasi Angkatan 2013 dan teman – teman FKK-1, Teori 1 khususnya FKK-1B yang selalu memberi warna baru dalam hidup dan kehidupan yang begitu berharga. Teman satu tim praktek Elvas, dan teman dari semester 1 sampai skripsi ini Hesty dan numi serta teman satu kos vida.

Demikian skripsi ini penulis buat, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis menerima kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan dan penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi peningkatan kualitas ilmu kefarmasian.

Surakarta, 8 Juni 2017



Dita Sulistyaningrum

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAM PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERSEMBAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	vi
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
INTISARI.....	xvi
ABSTRAC	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Tanaman Daun Sente	5
1. Klasifikasi tumbuhan	5
2. Morfologi tumbuhan	5
3. Khasiat tanaman.....	6
4. Kandungan kimia.....	6
4.1. Saponin	6
4.2.Flavonoid	6
4.3.Tanin/Polifenol	7
4.4.Alkaloid	7
4.5.Steroid/Triterpenoid.....	7
B. Simplisia.....	7
1. Pengertian simplisia.....	7
2. Pengumpulan simplisia.....	8
3. Pemilihan simplisia.....	8
4. Pengeringan simplisia.....	8
5. Penyerbukan.....	9
C. Penyarian.....	9
1. Ekstraksi.....	9
2. Maserasi	9

3. Fraksinasi	9
4. Pelarut	10
4.1.Etanol	10
4.2.N-heksana.....	10
4.3.Etil asetat.....	10
4.4.Air	11
D. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	11
1. Morfologi	11
2. Klasifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
3. Identifikasi bakteri	12
4. Toksin.....	13
5. Pengobatan.....	13
E. Antibakteri.....	14
1. Definisi antibakteri	14
2. Mekanisme kerja bakteri.....	14
2.1. Penghambatan metabolisme sel bakteri.....	14
2.2. Penghambatan sintesis dinding sel	14
2.3. Perubahan permeabilitas membran sel bakteri	15
2.4. Penghambatan sintesis protein sel bakteri	15
2.5. Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri....	15
3. Uji aktivitas antibakteri.....	15
3.1. Metode difusi	15
3.2. Metode dilusi	16
F. Siprofloksasin.....	17
1. Mekanisme kerja siprofloksasin.....	17
2. Efek samping siprofloksasin.....	17
3. Resistensi Siprofloksasin.....	17
G. Media.....	17
1. Media cair	18
2. Media setengah padat.....	18
3. Media padat.....	18
H. Sterilisasi.....	18
I. Landasan Teori	19
J. Hipotesis.....	22
BAB III METODE PENELITIAN	23
A. Populasi dan Sampel	23
B. Variabel Penelitian	23
1. Identifikasi variable utama	23
2. Klasifikasi variable utama	23
2.1.Variabel bebas.....	24
2.2.Variabel terkontrol.....	24
2.3.Variabel tergantung.....	24
3. Definisi operasional variable utama	24
C. Bahan dan Alat	25
1. Bahan	25
1.1.Bahan sampel.....	25

1.2.Bakteri uji	25
1.3.Medium.....	25
1.4.Bahan kimia	25
2. Alat	26
D. Jalan Penelitian	26
1. Determinasi tanaman	26
2. Pengambilan bahan	26
3. Pembuatan serbuk daun sente	26
4. Penetapan kadar air ekstrak dan serbuk daun sente	27
5. Pembuatan ekstrak daun sente	27
6. Penetapan persen rendemen.....	27
7. Tes bebas etanol ekstrak daun sente	27
8. Fraksinasi ekstrak daun sente	28
9. Uji kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun sente....	28
9.1.Identifikasi alkaloid	28
9.2.Identifikasi flavonoid.....	28
9.3.Identifikasi saponin.....	28
9.4.Identifikasi tanin	28
9.5.Identifikasi steroid/sterol	29
10. Sterilitas	29
11. Pembuatan biakan dan suspensi bakteri uji.	29
12. Identifikasi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
12.1. Isolasi pada media PSA	29
12.2. Identifikasi biokimia <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..	29
12.3. Identifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pengecatan	30
13. Pengujian antibakteri daun sente secara difusi	31
14. Pengujian antibakteri daun sente secara dilusi	31
E. Analisis hasil.....	32
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	38
1. Determinasi daun sente	38
2. Pembuatan serbuk daun sente	38
2.1 Pengambilan daun sente	38
2.2 Pengeringan daun sente	38
3. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun sente	39
4. Hasil pembuatan ekstrak daun sente	40
5. Hasil tes bebas etanol ekstrak daun sente	41
6. Fraksinasi	42
7. Hasil uji kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun sente	43
8. Hasil identifikasi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
8.1 Hasil identifikasi <i>Pseudomonas a.</i> secara goresan	45
8.2 Hasil uji biokimia bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	45
8.3 Hasil identifikasi <i>Pseudomonas a.</i> pengecatan Gram	48
9 Hasil uji antibakteri daun sente secara difusi dan dilusi	49
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
A. Kesimpulan	54

B. Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN.....	61

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Tanaman sente (<i>Alocasia macrorrhiza</i> (L.) G.Don)	5
2. Pewarnaan bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
3. Skema diagram kerja daun sente secara maserasi.....	33
4. Skema uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dan dilusi.....	34
5. Uji aktivitas antibakteri terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	35
6. Bagan kerja pembuatan suspensi bakteri dengan perbandingan 1 : 1000	36
7. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri fraksi daun sente terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	37
8. Hasil koloni <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada media PSA (<i>Pseudomonas Selective Agar</i>).....	45
9. Hasil uji biokimia <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
10. Hasil identifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> secara mikroskopis	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Presentase bobot kering terhadap bobot basah daun sente.....	39
2. Hasil penetapan kadar air serbuk daun sente	39
3. Hasil penetapan kadar air ekstrak daun sente.....	40
4. Hasil penetapan rendemen ekstrak etanol	41
5. Hasil uji organoleptis ekstrak daun sente	41
6. Hasil uji bebas alkohol pada ekstrak daun sente	41
7. Persen rendemen hasil fraksi	42
8. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak	43
9. Hasil identifikasi kandungan kimia fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air daun sente	44
10. Hasil identifikasi uji biokimia pada <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 2753	46
11. Hasil dimaeter zona hambat ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air dari daun sente.....	50
12. Hasil aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun sente terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Surat keterangan melakukan determinasi tanaman sente.....	61
2. Foto daun dan serbuk daun sente	62
3. Foto alat oven, <i>sterlling Bidwell</i> , maserasi, evaporator, ekstrak kental, autovortex, <i>Mc Farland</i> 0,5 dan tes bebas etanol ekstrak	63
4. Foto fraksinasi, hasil fraksi dan larutan stock.....	64
5. Foto identifikasi senyawa serbuk, ekstrak, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air dari daun sente	65
6. Foto hasil uji difusi	67
7. Foto hasil uji dilusi.....	70
8. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun sente.....	71
9. Perhitungan penetapan kadar air pada serbuk daun sente.....	72
10. Perhitungan persen rendemen ekstrak etnol.....	73
11. Pehtiungan penetapan kadar air pada ekstrak etanolik daun sente.....	74
12. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi <i>n</i> -heksana, etil asetat dan air.....	75
13. Pembuatan sediaan untuk uji difusi dan dilusi.....	76
14. Perhitungan diameter hambat pada uji antibakteri pada daun sente terhadap bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> secara difusi.....	78
15. Standr kekeruhan <i>Mc Farland</i> 0,5	80
16. Formulasi dan pembuatan media	81
17. Analisis ANOVA	84
18. Daftar singkatan	90

INTISARI

SULISTYANINGRUM, D., 2017, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI *n*-HEKSANA, ETIL ASETAT, DAN AIR DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SENTE (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don.) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Tanaman sente adalah tanaman yang secara empiris berkhasiat sebagai keputihan dan luka. Kandungan kimia tanaman sente adalah steroid, alkaloid, tanin, flavonoid dan saponin. Semua senyawa tersebut mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air daun sente sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Serbuk daun sente dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% kemudian dipekatkan dilanjutkan fraksinasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air. Hasil ekstraksi dan fraksinasi dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan menggunakan metode difusi, untuk mengetahui fraksi teraktif. Konsentrasi ekstrak dan fraksi yang digunakan untuk uji difusi adalah 40%, 20% dan 10%. Hasil uji difusi dilanjutkan uji dilusi, untuk menentukan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum, dengan seri konsentrasi 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,1563% dan 0,078%. Data difusi yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA.

Hasil penelitian pada uji difusi menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Fraksi etil asetat sebagai fraksi paling aktif dan fraksi etil asetat memiliki KBM sebesar 20%.

Kata kunci : daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don) , Antibakteri, difusi, dilusi, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

ABSTRACT

SULISTYANINGRUM, D., 2017, ACTIVITY TEST FRACTION *n*-HEXANE, ETHYL ACETAT, AND WATER FROM ETHANOLIC EXTRACT OF SENTE LEAF (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don.) AGAINTS BACTERIA *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753, Thesis, FACULTY OF PHARMACY, UNIVERSITY OF SETIA BUDI, SURAKARTA.

Sente plant is a plant that empirically efficacious as vaginal discharge and wound. Sente plants chemical constituents are essential steroid, alkaloid, tanin, flavonoid dan saponin. All of those compounds have antibacterial activity. This research was conducted to determine the ethanolic extract, fraction activity *n*-hexane, ethyl acetate and water of sente leafas antibacterial againts *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753.

The sente powder was macerated using ethanol 70, that was then concentrade, followed with fractionation using *n*-hexane, ethyl acetate and water solvet. Extract and fractions were tested about antibacterial activity to *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753 with diffusion method, to know the most active fraction. The concentration of extracts and fraction was use for diffusion test are 40%, 20% dan 10%. The dilution test from the result of diffusion test was use for determine the MBC (Minimum Bactericidal Concentration), with concentration 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,1563% dan 0,078%. Data difusion were analyzed with ANOVA.

The result of diffusion test showed that extract, fraction of *n*-hexane, ethyl acetat and water of sente leaf antibacterial activity to *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Fraction of ethyl acetate as the most active fraction and fraction of ethyl acetate has MBC of 20%.

Key word: Sente leaf (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don), Antibacterial, difusion, dilusion, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara tropis, dimana infeksi merupakan penyumbang nomor satu angka morbiditas dan mortalitas (Priyanto 2008). Hal ini didukung oleh kenyataan bahwa Indonesia merupakan negara yang sedang berkembang dengan jumlah penduduk ekonomi menengah ke bawah cukup tinggi dan rendahnya tingkat pendidikan, menyebabkan rendahnya juga tingkat kesehatan (IFPPD 2012).

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang dari waktu ke waktu terus berkembang. Infeksi merupakan suatu keadaan masuknya mikroorganisme ke dalam tubuh, berkembang biak dan menimbulkan penyakit, keadaan ini dapat ditinjau sebagai suatu tipe parasitisme yang terjadi bila suatu organisme hidup dengan merugikan organisme lain yaitu inangnya, parasit berkembangbiak dan aktif secara metabolik di dalam tubuh inang. Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh empat kelompok besar hama penyakit yaitu bakteri, jamur, virus dan kapang (Jawetz *et al.* 2005).

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri Gram negatif yang memiliki bentuk batang lurus atau lengkung, dapat ditemukan berpasangan, satu – satu, tidak mempunyai selubung, mempunyai flagel monotrika sehingga selalu bergerak (Mayasari 2005). Bakteri ini dapat hidup di lingkungan seperti tempat – tempat basah, pada instrumen - instrumen kedokteran rumah sakit, kamar mandi, tempat tidur, tinja dan kuit manusia yang dapat menyebabkan infeksi nosokomial. *Pseudomonas aeruginosa* dapat menginfeksi darah, kulit, telinga, mata dan saluran kemih, pada luka bakar akan menyerang darah sehingga menghasilkan nanah (Mudihardi *et al.* 2005).

Antibiotik yang sering digunakan pada infeksi *Pseudomonas aeruginosa* adalah penisilin yang dikombinasi dengan aminoglikosida, *aztreonam*, *imipenem*, *quinolon*, termasuk siprofloksasin. Siprofloksasin merupakan agen generasi

kedua, salah satu obat sintetik derivat *quinolon*. Mekanisme kerjanya adalah menghambat aktivitas DNA *gyrase* bakteri, bersifat bakterisid dengan spektrum luas terhadap bakteri Gram-positif maupun negatif. Siprofloksasin efektif digunakan untuk infeksi saluran kemih, uretritis, demam tifoid dan paratifoid, infeksi saluran napas, infeksi jaringan lunak serta osteomielitis. Obat ini dapat juga digunakan sebagai antimikroba profilaksis pada penderita netropenia. Walaupun obat ini dapat bermanfaat pada eksaserbasi fibris kistik akibat *Pseudomonas*, kurang lebih sepertiga dari organisme mukoid semacam ini bersifat resisten (Irene 2011). Kenyataan ini mendorong untuk menemukan alternatif pengobatan lain dengan menggunakan tanaman.

Salah satu tanaman yang secara etnobotani dan bisa digunakan sebagai obat alami adalah tanaman sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don). Tanaman ini tumbuh subur di tempat terbuka dan sedikit terlindungi serta memiliki berbagai manfaat, antara lain secara empiris tanaman sente digunakan oleh masyarakat sebagai antiradang, anti *swelling*, dan penurunan panas. Herba ini juga bisa digunakan untuk mengobati panas malaria, influenza, rematik, diare, TBC paru – paru, luka, keputihan (Ulung & Wahyu 2014).

Berdasarkan hasil penelitian Agustina (2016) menyatakan bahwa ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun sente mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Dimana fraksi etil asetat dengan konsentrasi 1,25% dari daun sente merupakan fraksi yang paling efektif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Penelitian lain menyatakan bahwa ekstrak etanol, kloroform dan petroleum eter dari daun *Alocasia indica* efektif terhadap gram negatif, gram positif dan jamur (Mulla *et al.* 2010). Ekstrak air, petroleum eter, kloroform, acetone, dan etanol dari daun *Alocasia indica* memiliki aktivitas sebagai antibakteri terutama pada *Staphylococcus aerus* menunjukkan nilai KHM sebesar 0,12 mm, 0,16 mm, 0,10 mm, 0,10 mm, dan 0,12 mm (Mulla *et al.* 2010). Dimana *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram negatif, sehingga besar kemungkinan daun sente (*Alocasia macrorrhiza*) dapat menghambat bakteri gram negatif lainnya.

Penelitian lainnya terhadap genus *Alocasia* diantaranya yaitu tanaman *Alocasia sanderiana* Bull. mengandung senyawa aktif antibakteri seperti

glikosida, tanin, triterpen, dan sterol. Dimana menurut penelitian Romeo (2012) menyatakan bahwa fraksi metanol, diklormetana dan heksana dari ekstrak daun *Alocasia sanderiana* memiliki zona hambat pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 1 mm, 3 mm dan 0 mm. Srivastava (2012) terkait dengan tanaman sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.)G.Don) menunjukkan pada skrining fitokimia positif mengandung senyawa yang sama dengan *Alocasia sanderiana*, sehingga besar kemungkinan daun sente memiliki aktivitas antibakteri karena mengandung senyawa – senyawa yang relatif sama dengan *Alocasia sanderiana* yaitu flavonoid, glikosida dan triterpen.

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi yang dilanjutkan dengan fraksinasi. Pelarut yang digunakan pada metode maserasi adalah etanol 70% karena hampir semua komponen aktif dari tanaman seperti flavonoid, fenol, terpenoid dan minyak atsiri dapat larut dalam etanol (Tiwari *et al.* 2011). Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan golongan utama kandungan satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya dan memperoleh senyawa dalam jumlah maksimal. Pelarut yang digunakan pada proses fraksinasi adalah pelarut *n*-heksana yang dapat menyari senyawa kimia yang bersifat nonpolar yaitu steroid, triterpenoid, serta karotenoid. Pelarut etil asetat bersifat semipolar yang dapat menarik senyawa kimia yaitu flavonoid, alkaloid dan senyawa – senyawa fenol, sedangkan pelarut air yang bersifat polar dapat menarik senyawa kimia yaitu glikosida, minyak menguap, lendir, peptida dan asam organik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi *n*-heksana, etil asetat dan fraksi air ekstrak etanolik daun sente yang berpotensi sebagai antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan menggunakan metode dilusi dan difusi. Tujuan menggunakan metode dilusi dan difusi adalah untuk mendapatkan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air hasil fraksinasi ekstrak etanolik serbuk daun sente.

B. Perumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini adalah pertama, apakah ekstrak etanol dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) dari daun sente mempunyai aktivitas antibakteri dan dari ketiga fraksi atau ekstrak etanol daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) tersebut manakah yang teraktif dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853?

Kedua, berapakah KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dari fraksi teraktif ekstrak etanol daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan pertama penelitian ini adalah untuk mengetahui ekstrak etanol dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) dari daun sente mempunyai aktivitas antibakteri dan dari ketiga fraksi atau ekstrak etanol daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) tersebut manakah yang teraktif dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Kedua, untuk mengetahui KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dari fraksi teraktif ekstrak etanol daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

D. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan bagi ilmu pengetahuan di bidang obat tradisional dan digunakan sebagai masukan bagi masyarakat dalam upaya memanfaatkan daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

BAB II

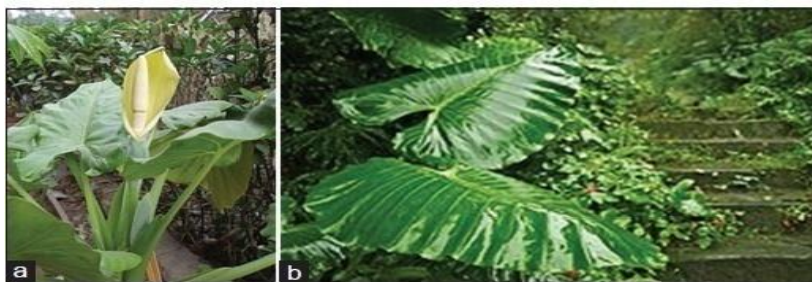
TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Daun Sente

1. Klasifikasi tumbuhan

Menurut Srivastava (2013) sistematika tanaman sente secara lengkap adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivision : Spermatophyta
Division : Magnoliophyta
Clasis : Liliopsida
Subclass : Arecidae
Ordo : Arales
Family : Araceae
Genus : Alocasia
Spesies : *Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don



Gamabar 1. a dan b tanaman sente *Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don.
Sumber Jurnal (Joshi dkk. 2015).

2. Morfologi tumbuhan

Tanaman sente merupakan herba tanaman dengan tinggi 1 -2 m. Batang tegak, tidak berkayu, berbentuk bulat dan berwarna kekuningan. Daun tunggal, berbentuk jantung, pangkal berlekuk, ujung runcing, tepi rata, panjang 25-75 cm dan berwarna hijau. Bunga tongkol, berbentuk silindris, keluar dari ketiak daun, Panjang tangkai 20 -30 cm, ramping dan berwarna hijau. Buah, diameter 5 cm,

dan berwarna hijau. Biji berbentuk bulat panjang, beralur membujur dan berwarna hijau (Agromedia 2008).

3. Khasiat tanaman

Secara empiris tanaman sente digunakan oleh masyarakat sebagai antiradang, anti *swelling* dan penurun panas. Selain itu herba ini juga bisa digunakan untuk mengobati panas malaria, influenza, rematik, diare, TBC paru – paru keputihan dan luka (Ulung & Wahyu 2014).

4. Kandungan kimia

Tanaman sente mengandung banyak senyawa aktif seperti steroid, alkaloid, tanin/polifenol, flavonoid dan saponin (Rohman 2015; Mubeen *et al.* 2012). Kandungan senyawa tersebut yang bertanggung jawab memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

4.1. Saponin. Saponin adalah glikosida triterpen dan sterol yang telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemodialisis sel darah (Harbone 2006). Saponin termasuk dalam kelompok antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai macam komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida (Rahmawati dkk 2014). Saponin dapat menjadi antibakteri karena zat aktif permukaannya mirip detergen, akibatnya saponin akan menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran. Rusaknya membran sel ini sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri (Harbone 2006).

4.2. Flavonoid. Senyawa flavonoid merupakan golongan senyawa fenolik, yang diduga mekanisme kerjanya dengan mendenaturasi protein sel dan merusak membran sel mikroorganisme. Suatu substansi yang dapat mendenaturasi protein dan merusak sel tanpa dapat diperbaiki lagi (*irreversible*) sehingga pertumbuhan mikroba terganggu (Rinawati 2011). Flavonoid bersifat desinfektan yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein yang dapat menyebabkan aktifitas metabolisme sel bakteri berhenti (Wibowo 2012).

4.3. Tanin. Tanin tergolong senyawa polifenol dengan karakteristiknya yang dapat membentuk senyawa kompleks dengan makro molekul lainnya (Waghorn 2003). Tanin/polifenol dapat berikatan dengan dinding sel mikroorganisme rumen dan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim (Dalimartha 2005). Mekanisme kerja antibakteri tanin/polifenol juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Sari *et al.* 2011).

4.4. Alkaloid. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Alkaloid dapat ditemukan dalam berbagai bagian tumbuhan seperti biji, daun, ranting dan kulit batang. Alkaloid umumnya ditemukan dalam kadar yang kecil dan harusnya dipisahkan dari campuran senyawa yang rumit yang berasal dari tumbuhan (Herbert 1995). Alkaloid dapat mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak berbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian bakteri (Poeloengan dkk 2010).

4.5. Steroid/triterpenoid. Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana (Harbone 2006; Robinson 1995). Mekanisme kerja steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada lapisan liposom (Madduluri 2013).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun atau telah diolah secara sederhana. Simplisia dapat berupa simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikans atau mineral. Simplisia nabati adalah simplisia yang berasal dari tanaman utuh baik berupa tanaman utuh, bagaimana tanaman atau eksudat tanaman. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh, bagaian hewan atau zat – zat yang dihasilkan oleh

hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia berupa bahan pelikan atau mineral yang belum atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Dalimartha 2008).

2. Pengumpulan simplisia

Bagian yang digunakan adalah helaian daun. Kadar senyawa aktif dalam satu simplisia berbeda – beda tergantung pada bagian yang digunakan, umur tanaman atau bagian tanaman saat dipanen, waktu pemanenan dan lingkungan tempat tumbuh. Pembentukan senyawa aktif sangat erat dengan waktu panen (Depkes RI 1985).

3. Pemilihan simplisia

Proses pemilihan simplisia berguna untuk memisahkan simplisia berguna dari bahan asing yang tidak berbahaya dalam jumlah yang sangat kecil yang terdapat dalam simplisia yang umumnya bersifat merugikan. Simplisia nabati harus bebas dari serangga, fragmen hewan atau kotoran hewan, tidak boleh menyimpang bau dan warnanya, tidak boleh menggunakan lendir dan cendawa atau menunjukkan tanda – tanda pengotor lain, tidak boleh mengandung bahan lain yang beracun atau berbahaya (Depkes RI 1985).

4. Pengeringan simplisia

Tujuan pengeringan simplisia adalah untuk menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri. Pengeringan bahan simplisia dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu pengeringan di bawah sinar matahari adalah suhu dan kelembapan yang tidak terkontrol, membutuhkan tempat yang luas dan terbuka sehingga kemungkinan terjadi kontaminan mikrob lebih besar. Pengeringan di tempat teduh biasanya digunakan untuk bahan baku yang kandungan utamanya minyak atsiri atau senyawa lain yang termostabil (Depkes RI 2008). Pelaksanaan pengaturan pengeringan ditentukan dari bentuk atau bagian bahan yang dikeringkan. Bagian yang tipis seperti bunga dan daun tidak perlu dipotong. Pengeringan untuk daun paling baik adalah dengan cara diangin – anginkan atau terlindungi dari sinar matahari (Depkes RI 1985).

5. 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 (Voigt 1995).

C. Penyarian

1. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Mukhrani 2014). Cairan penyari yang digunakan antara lain air, eter, atau campuran etanol dan air. Penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat menggunakan pelarut yang dipilih sehingga zat yang diinginkan larut. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi untuk memperoleh ekstrak yang sempurna dari obat. Sifat dari bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih suatu metode ekstraksi (Tiwari *et al.* 2011).

2. Maserasi

Maserasi adalah proses penyarian simplisia menggunakan pelarut dengan berbagai kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar (Ditjen POM 2000). Keuntungan ekstraksi dengan cara maserasi adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana, sedangkan kerugiannya yakni pengerjaannya lama, membutuhkan pelarut yang banyak dan penyarian kurang sempurna. Dalam maserasi (untuk ekstrak cairan), serbuk halus atau kasar dari tumbuhan obat yang kontak dengan pelarut disimpan dalam wadah tertutup untuk periode tertentu dengan pengadukan yang sering, sampai zat tertentu dapat terlarut. Metode ini cocok digunakan untuk senyawa yang termolabil (Tiwari *et al.* 2011).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawanya yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa – senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula

senyawa yang bersifat nonpolar akan masuk ke pelarut nonpolar (Tiwari *et al.* 2011).

4. Pelarut

4.1. Etanol. Etanol merupakan pelarut serba guna untuk ekstraksi pendahuluan. Ekstraksi senyawa fenol pada tumbuhan dengan etanol mendidih biasanya mencegah terjadinya oksidasi enzim (Harborne 1987). Etanol sebagai penyari dapat memperbaiki stabilitas bahan terlarut keuntungan lainnya adalah sifatnya untuk menghambat kerja enzim. Umumnya berlaku sebagai pengekstraksi dengan campuran bahan pelarut yang berlainan terutama campuran etanol air dengan etanol 70% dapat dihasilkan suatu bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengotor hanya dengan skala kecil turut dengan cairan pengekstraksi (Voight 1989).

Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antraknon, flavonoid, steroid, damar, klorofil, lemak, malam, tanin, dan saponin hanya sedikit larut. Zat pengganggu yang larut dalam etanol hanya terbatas (Depkes RI 1986).

4.2. *n*-heksana. Pelarut *n*-heksana adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih, terdiri dari suatu campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna, transparan, bersifat mudah terbakar, baunya khas, tidak dapat larut dalam air, dapat larut dalam alkohol, benzene, khloroform, eter. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksana yaitu senyawa yang bersifat nonpolar seperti triterpenoid, terpenoid, sterol dan fenil propan (Tiwari *et al.* 2011). Pemilihan pelarut *n*-heksana pada penelitian ini karena pelarut ini memiliki nilai tetapan dielektrik yang lebih kecil dibandingkan pelarut nonpolar lainnya seperti kloroform, benzene dan sikloheksana yaitu sebesar 2,0. Semakin kecil nilai tetapan dielektrik dari pelarut maka pelarut tersebut semakin bersifat nonpolar (Khopkar 2003).

4.3. Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut dengan karakteristik semipolar. Etil secara selektif akan menarik senyawa yang bersifat semipolar seperti fenol dan terpenoid (Tiwari, *et al.* 2011). Etil asetat merupakan suatu cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah. Etil asetat larut dalam 15 bagian air, dapat tercampur dengan eter, etanol, dan kloroform. Etil asetat adalah

pelarut semi polar, mudah terbakar dan menguap, maka penyimpanannya dalam wadah yang tertutup rapat serta terhindar dari panas. Etil asetat dapat menyari komponen minyak atsiri tertentu, asam lemak, dan senyawa fenolik seperti fenol-fenol, asam fenolat, fenil propanoid, dan flavonoid (Harborne 1987).

4.4. Air. Air adalah pelarut *universal*, biasanya digunakan untuk mengekstraksi produk tumbuhan dengan aktivitas antimikroba. Meskipun pengobatan secara tradisional menggunakan air sebagai pelarut, tetapi ekstrak tumbuhan dari pelarut organik telah ditemukan untuk memberikan aktivitas antimikroba lebih konsisten dibandingkan dengan ekstrak air. Air juga melarutkan senyawa fenolik yang memiliki aktivitas penting sebagai antioksidan (Tiwari *et al*, 2011). Air yang banyak dipakai sebagai larutan penyari karena murah, mudah didapat, stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan alamiah. Kerugian penggunaan air sebagai penyari adalah tidak selektif, sari dapat ditumbuhi kapang dan kuman sehingga cepat rusak, dan untuk pengeringan diperlukan waktu yang lama (Depkes RI 1986).

D. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

1. Morfologi

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang lurus atau lengkung, berukuran sekitar 0,6 x 2 µm. Dapat ditemukan satu – satu, berpasangan, dan kadang membentuk rantai pendek, tidak mempunyai spora, tidak mempunyai selubung, serta mempunyai flagel monotrika (flagel tunggal pada kutub) sehingga selalu bergerak (Mayasari 2005).

2. Klasifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

Menurut Holt *et al* (1994) sistematika bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Proteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Familia	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Spesies	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>



Gambar 2. Pewarnaan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
Sumber Todar 2008.

3. Identifikasi bakteri

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri obligat aerob yang mudah tumbuh pada berbagai medium kultur, kadang - kadang menghasilkan aroma yang manis atau berbau, seperti anggur. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni yang bundar dan licin dengan warna kehijauan yang berflouresensi. Bakteri ini sering menghasilkan pigmen kebiruan tak berflouresens, piosianin yang berdifusi ke dalam agar. Banyak galur *Pseudomonas aeruginosa* juga menghasilkan pigmen berflouresensi, pioverdin yang memberikan warna kehijauan pada agar. Beberapa galur menghasilkan pigmen merah gelap, piorubin, atau pigmen hitam, piomelanin.

Pseudomonas aeruginosa tumbuh dengan baik pada suhu 37-42°C, bersifat oksidase-positif. *Pseudomonas aeruginosa* tidak memfermentasi karbohidrat, tetapi banyak galur yang mengoksidasi glukosa. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* biasanya didasarkan pada morfologi koloni, kepositifan oksidase, adanya pigmen khas, dan pertumbuhan pada suhu 42°C (Jawetz *et al* 2012).

4. Toksin

Pseudomonas aeruginosa hanya patogen bila masuk ke dalam daerah pertahanan normalnya tidak ada atau bila berperan dalam infeksi campuran. Kuman ini menyebabkan infeksi luka dan luka bakar membentuk nanah yang berwarna biru-hijau; meningitis, bila dimasukkan dalam punksi lumbal; dan

infeksi saluran kemih, bila dimasukkan dalam kateter dan alat – alat atau dalam larutan irigasi. Terserangnya saluran napas, khususnya dari alat respirator yang terkontaminasi mengakibatkan “*necrotizing pneumonia*”. Terdapat strain *Pseudomonas* mukoid, khususnya pada penderita dengan fibrosis kistik paru – paru atau bronkiektosis. Infeksi jaringan kornea dapat menyebabkan kebutaan. Infeksi lokal kuman ini dapat menyebar melalui darah, sehingga dapat menyebabkan sepsis dan lesi fokal pada jaringan lain. Pada sepsis angka kematian dapat mencapai 80% (Jawetz *et al.* 2005).

Pseudomonas aeruginosa dapat mensintesis toksin dan enzim yang mematikan bagi manusia. Lipid A (endotoksin) berada di dinding sel dari bakteri merupakan zat penyebab demam, vasodilatasi, inflamasi dan gejala lainnya. Exotoxin A dan Exoenzim S dapat menghambat sintesis protein eukariotik sel yang menyebabkan kematian sel. *Pseudomonas aeruginosa* juga memiliki enzim elastase yang dapat mempunyai efek sitotoksik dan mempermudah invasi organisme ini ke dalam pembuluh darah (Bauman 2007).

5. Pengobatan

Pseudomonas aeruginosa dapat menyebabkan infeksi pneumonia, bakteremia, otitis eksterna, infeksi okular dan infeksi saluran kemih. Antibiotik β -laktam, kuinolon dan aminoglikosida merupakan pilihan utama bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Bamford & Gillespie 2007).

Antibiotik pilihan pertama bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah penisilin antipseudomonas dan golongan aminoglikosida seperti gentamisin, tobramisin dan amikasin. Antibiotik alternatif untuk *Pseudomonas aeruginosa* adalah penisilin dikombinasi kuinolon, cefepime, ceftazidime, imipenem, meropenem atau aztreonam dikombinasi aminoglikosida (Katzung 2007).

E. Antibakteri

1. Definisi antibakteri

Antibakteri adalah suatu senyawa yang dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan suatu mikroorganisme (Jawetz *et al* 2007). Beberapa istilah yang digunakan untuk menjelaskan proses

pembasmian bakteri yaitu germasid, bakterisid, bakteristatik, antiseptik, desinfektan (Dianasari 2009).

Germasid adalah bahan yang dipakai untuk membasmi mikroorganisme dengan mematikan sel – sel vegetatif, tetapi tidak selalu mematikan bentuk sporanya. Bakterisid adalah bahan yang dipakai untuk mematikan bentuk – bentuk vegetatif bakteri. Bakteristatik adalah suatu bahan yang mempunyai kemampuan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme dengan mencegah pertumbuhan atau menghambat pertumbuhan bakteri tanpa mematikan. Antiseptik adalah suatu bahan yang menghambat atau membunuh mikroorganisme dengan mencegah pertumbuhan atau menghambat aktivitas metabolisme, digunakan pada jaringan hidup. Desinfektan adalah bahan yang dipakai untuk membasmi bakteri dan mikroorganisme patogen tapi belum tentu beserta sporanya, digunakan pada benda mati (Pelczar & Chan 1988).

2. Mekanisme kerja antibakteri

2.1. Penghambatan metabolisme sel bakteri. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari Asam Para Amino Benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antibakteri bila bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembuatan asam folat, maka terbentuk analog asam folat nonfungsional, sehingga kebutuhan akan asam folat tidak terpenuhi, hal ini bisa menyebabkan bakteri mati (Gunawan&Mayuni 2009).

2.2. Penghambatan sintesis dinding sel. Dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubah setelah selesai terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Gunawan&Mayuni 2009).

2.3. Perubahan permeabilitas membran sel bakteri. Selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat – zat yang terlarut lainnya. Kerusakan beberapa membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain – lain (Gunawan&Mayuni 2009).

2.4. Penghambatan sintesis protein sel bakteri. Bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Antibakteri bekerja dalam menyebabkan kode pada mRNA yang salah dibaca tRNA pada sintesis protein yang abnormal dan fungsional bagi sel mikroba (Gunawan&Mayuni 2009).

2.5. Penghambatan sintesis asam nukleat sel bakteri. Contoh pada rifampisin yang berikatan dengan enzim polimerase RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA sel mikroba begitu juga dengan 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 (Gunawan&Mayuni 2009).

3. Uji Aktivitas Antibakteri

3.1 Metode difusi

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

Metode cakram (*tes Kirby & Bauer*) menggunakan piringan atau cakram yang berisi agen antimikroba, kemudian diletakkan pada media agar yang sebelumnya telah ditanami mikroorganisme sehingga agen antimikroba dapat berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Pratiwi 2008).

Pengujian ini dapat dievaluasi ada atau tidaknya aktivitas antibakteri dengan melihat kemampuan ekstrak tersebut menghambat pertumbuhan bakteri pada media tersebut. Daerah hambatan yang terbentuk ditunjukkan dengan lingkungan bening di sekitar cakram yang berisi larutan uji (Rostiana 2007). Ukuran cakram yang digunakan 6 mm.

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

3.2 Metode dilusi

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

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

F. Siprofloksasin

1. Mekanisme kerja siprofloksasin

Antibiotik golongan flurokuinolon merupakan obat bakterisidal yang kuat terhadap bermacam – macam mikroorganisme. Target antibiotik siprofloksasin adalah DNA ginase bakteri dan topoisomerase IV. Topoisomerase IV adalah target primer untuk sejumlah bakteri gram-negatif. Siprofloksasin menghambat gulungan (supercoiling) DNA yang diperantarai oleh girase pada konsentrasi yang berhubungan dengan kerja antibakteri efektifnya. Mutasi *gyrA* adalah dapat

memberikan resistensi terhadap obat ini. Topoisomerase IV memisahkan molekul DNA tertaut silang yang dihasilkan dari replikasi DNA dan juga merupakan target dari siprofloksasin (Goodman & Gilman 2010).

2. Efek samping siprofloksasin

Mual ringan, muntah, gangguan abdominal, diare dan kolitis jarang terjadi, sakit kepala ringan, pening, halusinasi, delirium, dan seizure sangat jarang terjadi, ruam, reaksi fotosensitivitas, leukopenia, eosinofilia (Goodman & Gilman 2010).

3. Resistensi siprofloksasin

Resistensi terhadap kuinolon dapat berkembang melalui mutasi dalam gen kromosom bakteri yang mengkode DNA gyrase atau topoisomerase IV atau melalui transpor aktif obat keluar dari bakteri. Tidak ada mekanisme penginaktivasi kuinolon yang telah teridentifikasi. Sensitivitas telah menurun, khususnya pada *Pseudomonas* dan *Staphylococcus*. Flurokuinolon juga menurun pada *Salmonella*, *Neisseria gonorrhoeae* dan *Streptococcus pneumoniae* (Goodman & Gilman 2010).

G. Media

Media merupakan suatu bahan yang terdiri dari campuran zat – zat untuk menumbuhkan mikroorganisme, isolasi, memperbanyak jumlah, menguji sifat – sifat fisiologis dan perhitungan jumlah mikroorganisme. Proses pembuatan media harus disterilisasi dan menerapkan metode sepsis untuk menghindari kontaminasi pada media (Sumarsih 2003). Pembiakan mikroorganisme untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme dan pergerakan. Lazimnya, media biakan berisi air, sumber energi, zat hara sebagai sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen, hidrogen serta unsur – unsur lain. Dalam bahan dasar media dapat pula ditambahkan faktor pertumbuhan berupa asam amino, vitamin atau nukleotida. Media yang digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangkan mikroorganisme tersebut harus sesuai susunanya dengan kebutuhan jenis – jenis mikroorganisme yang bersangkutan. Media berdasarkan bentuk terbagi menjadi tiga bagian, yaitu :

1. Media cair

Media cair juga dikenal dengan media sintetik. Media sintetik digunakan untuk mempelajari sifat faal dan genetika mikroorganisme. Media sintetik merupakan media yang mempunyai kandungan dan bahan yang telah diketahui secara terperinci. Senyawa anorganik dan senyawa organik yang ditambahkan dalam media sintetik harus murni. Contoh media sintetik : cairan Hanks, Locke, Eagle (Waluyo 2004).

2. Media setengah padat

Media ini digunakan untuk melihat gerak kuman secara mikroskopis. Media setengah padat merupakan media yang dibuat dengan bahan yang sama dengan media padat, akan tetapi yang berbeda adalah komposisi agarnya (Waluyo 2004).

3. Media padat

Media padat diperoleh dengan menambahkan agar – agar. Agar berasal dari ganggang/alga yang berfungsi sebagai bahan pematat, karena bahan ini tidak terurai oleh mikroorganisme, dan dapat membeku pada suhu 45°C (Waluyo 2004).

H. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang digunakan dalam bidang mikrobiologi harus dalam keadaan steril. Steril artinya tidak didapatkan mikroba yang tidak diharapkan kehadirannya, baik yang mengganggu atau merusak media atau mengganggu kehidupan dan proses yang sedang dikerjakan (Waluyo 2004). Sterilisasi merupakan suatu tindakan untuk membebaskan alat dan media dari mikroba. Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah dan kering, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar \times , sinar α dan sinar UV untuk bahan yang tidak akan berubah akibat temperatur tinggi; sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin; dan sterilisasi secara mekanik yaitu penggunaan saringan atau filter untuk bahan yang akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi mengalami perubahan atau penguraian (Damandi 2008). Sebuah metode fisikokimia merupakan penggabungan baik metode fisik dan kimia. Penggunaan steamformaldehida adalah metode sterilisasi fisikokimia (Rao 2008).

I. Landasan teori

Pseudomonas aeruginosa merupakan salah satu bakteri yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia. *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri Gram negatif termasuk famili Pseudomonaceae, merupakan pathogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi pada manusia. *Pseudomonas aeruginosa* terdapat di tanah dan air, pada beberapa orang merupakan flora normal di kolon (usus besar) juga dapat dijumpai pada daerah lembab dikulit dan dapat membentuk koloni pada saluran pernafasan bagian atas bagi pasien – pasien rumah sakit (Mayasari 2005). Bakteri ini menjadi penyebab dire pada bayi, infeksi saluran kemih dan menyebabkan infeksi sekunder pada luka (Gupte 1990).

Antibiotik golongan flurokuinolon (siprofloksasin) merupakan obat bakterisidal yang kuat terhadap bermacam – macam mikroorganisme. Siprofloksasin telah digunakan pada infeksi - infeksi jaringan – jaringan tulang, tulang – tulang, dan persendian – persendian dan pada intra – abdominal dan infeksi – infeksi saluran nafas, termasuk infeksi – infeksi yang disebabkan oleh organisme yang resisten banyak obat seperti *Pseudomonas aeruginosa* dan *Enterobacter* (Katzung 2007).

Tingkat penggunaan antibiotik yang tinggi, semula tujuan awal diharapkan dapat memusnahkan bakteri penyebab infeksi, ternyata kini menimbulkan masalah baru yaitu timbulnya bakteri yang resisten sehingga mendorong para peneliti untuk mencari obat baru yang lebih efektif untuk penyakit infeksi. Mengingat kandungan khasiat tanaman obat yang dimanfaatkan bagi kesehatan dan terbukti efektif, efisien, ekonomis, maka sudah saatnya jika pemanfaatan tanaman dioptimalkan (Wijayakusuma *et al.* 1992; Saepudin *et al.* 2007).

Salah satu tanaman yang secara etnobotani dan bisa digunakan sebagai obat alami adalah tanaman sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don). Tanaman ini tumbuh subur di tempat terbuka dan sedikit terlindungi dan memiliki berbagai manfaat, antara lain secara empiris tanaman sente digunakan oleh masyarakat sebagai antiradang, anti *swelling*, dan penurunan panas. Herba ini juga bisa digunakan untuk mengobati panas malaria, influenza, rematik, diare, TBC paru – paru, luka, keputihan (Ulung & Wahyu 2014).

Berdasarkan hasil penelitian Agustina (2016) menyatakan bahwa ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun sente mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Dimana fraksi etil asetat dengan konsentrasi 1,25% dari daun sente merupakan fraksi yang paling efektif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Penelitian lain menyatakan bahwa ekstrak etanol, kloroform dan petroleum eter dari daun *Alocasia indica* efektif terhadap gram negatif, gram positif dan jamur (Mulla *et al.* 2010). Ekstrak air, petroleum eter, kloroform, aceton, dan etanol dari daun *Alocasia indica* memiliki aktivitas sebagai antibakteri terutama pada *Staphylococcus aerus* menunjukkan nilai KHM sebesar 0,12 mm, 0,16 mm, 0,10 mm, 0,10 mm, dan 0,12 mm (Mulla *et al.* 2010). Dimana *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram negatif, sehingga besar kemungkinan daun sente dapat menghambat bakteri gram negatif lainnya.

Penelitian lainnya terhadap genus *Alocasia* diantaranya yaitu tanaman (*Alocasia sanderiana* bull) mengandung senyawa aktif antibakteri seperti glikosida, tanin, triterpen, dan sterol. Dimana menurut penelitian Romeo (2012) menyatakan bahwa fraksi metanol, diklormetana dan heksana dari ekstrak daun dari *Alocasia sanderiana* memiliki zona hambat pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 1 mm, 3 mm dan 0 mm. Srivastava (2012) terkait dengan tanaman sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.)G.Don) menunjukkan pada skreening fitokimia positif mengandung senyawa yang sama dengan *Alocasia senderiana*, sehingga besar kemungkinan daun sente memiliki aktivitas antibakteri karena mengandung senyawa – senyawa yang relatif sama dengan *Alocasia senderiana* yaitu flavonoid, glikosida dan triterpen.

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi dengan pelarut etanol 70%, kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan tiga pelarut yang mewakili tingkat kepolarannya. Maserasi merupakan proses paling tepat dimana obat yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dan membenstrum sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat – zat yang mudah larut akan melarut (Ansel 2005).

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu golongan utama, pemisahan senyawa berdasarkan kepolarannya (Harborne 2006). Pelarut yang digunakan dalam fraksi adalah *n*-heksana, etil asetat dan air. *n*-heksana bersifat nonpolar, etil asetat bersifat semipolar, dan air bersifat polar.

Berdasarkan ketiga macam pelarut tersebut, diduga fraksi teraktif yang terdapat dalam ekstrak etanol daun sente terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah fraksi etil asetat. Adanya kemungkinan dugaan tersebut didasarkan pada penelitian Agustina (2016) tentang daun sente sebagai antibakteri menyatakan bahwa fraksi teraktif dari pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air adalah fraksi etil asetat dengan konsentrasi 1,25%. Selain itu, adanya kandungan senyawa zat aktif daun sente yang terlarut dalam pelarut etil asetat seperti flavonoid dan alkaloid. Flavonoid merupakan komponen terbesar golongan fenol yang terdapat di dalam tumbuhan alam dan memiliki daya antimikroba dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein yang larut dengan dinding sel (Ardananuridin *et al.* 2004), sedangkan alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri yang diduga dapat mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Robinson 1995).

Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan metode dilusi dan difusi. Metode difusi yang digunakan adalah metode cakram (*tes Kirby & Bauer*) menggunakan piringan atau cakram yang berisi agen antimikroba, kemudian diletakkan pada media agar yang sebelumnya telah ditanami mikroorganisme sehingga agen antimikroba dapat berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Pratiwi 2008).

Metode dilusi merupakan metode yang menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Dasar penelitian ini adalah dengan cara media diinokulasi bakteri uji dan dieramkan (Jawetz *et al.* 2007). Tahap akhir antimikroba dilarutkan dengan kadar yang menghambat atau mematikan berdasarkan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 27835 di tabung reaksi dan di media selektif. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan berdasarkan hasil pengamatan tabung reaksi, sedangkan untuk konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan berdasarkan hasil pengamatan pada media PSA, dimana konsentrasi terkecil adalah konsentrasi paling efektif.

J. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori yang ada, disusun hipotesis dalam penelitian ini adalah :

Pertama, ekstrak etanolik, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) mempunyai aktivitas antibakteri. Dan dari ketiga fraksi atau ekstrak etanol dari daun sente yang mempunyai aktivitas teraktif dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah fraksi etil asetat.

Kedua, fraksi teraktif ekstrak etanol daun sente mempunyai nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun dari tanaman sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) yang diperoleh dari daerah Surakarta, Jawa tengah.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) diambil secara acak dengan memilih helaian daun yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, berwarna hijau, segar, dan bebas dari hama diperoleh dari daerah Mojosongo, Kecamatan Jebres, Surakarta, Jawa Tengah.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don), fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanolik daun sente.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel menurut fungsinya dalam penelitian dapat diklasifikasikan berdasar pola hubungan sebab akibat menjadi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel kendali. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah – ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel terkendali adalah variabel yang mempelajari variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian 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*-heksana, etil asetat, dan air dari ekstrak etanolik daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) dengan berbagai konsentrasi.

2.2 Variabel terkendali. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 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*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sente adalah daun yang diperoleh dari tanaman daun sente (*Alocasia macrorrhiza*(L.) G.Don) yang diambil dari daerah Surakarta, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun sente adalah daun sente yang telah dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan dalam alat pengering (oven) pada suhu 50°C, lalu diserbuk dan diayak dengan ayakan no. 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun sente adalah hasil ekstraksi daun sente dengan larutan penyari etanol 70% menggunakan metode maserasi selama 5 hari kemudian dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu 50°C dan dilanjutkan dengan fraksinasi.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah fraksi dari ekstrak etanol 70% daun sente yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, kemudian dipekatkan dengan *evaporator* sehingga didapat fraksi *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksinasi dari residu *n*-heksana daun sente dengan menggunakan etil asetat, kemudian dipekatkan dengan *evaporator* sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah hasil fraksinasi dari residu etil asetat daun sente dengan menggunakan air.

Ketujuh, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi dan dilusi untuk frakti teraktif. Metode difusi yaitu mengukur luas daerah hambatan yaitu daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri, dengan kontrol negatif adalah DMSO 5% dan kontrol positif antibiotik siprofloksasin. Metode dilusi yaitu berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi dengan cara penapisan hingga konsentrasi akhir sebagai berikut : 40%, 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,62%; 0,31%; 0,15%; 0,08%.

C. Bahan dan alat

1. Bahan

1.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) yang diperoleh dari daerah Surakarta, Jawa Tengah.

1.2. Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

1.3. Medium. Media ini digunakan untuk menangkap dan menumbuhkan BHI (*Brain Heart Infusion*), MHA (*Muller Hinton Agar*), Reagen untuk pengecatan Gram, larutan kristal violet (Gram A), lugol iodine (Gram B), etanol 70% (Gram C), safranin (Gram D). Media untuk uji biokimia yaitu *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Kliger Iron Agar* (KIA), *Lysin Iron Agar* (LIA) dan Citrat Agar, *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA).

1.4. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, *n*-heksan, etil asetat, aquadest steril, HCl, H₂SO₄ pekat, serbuk Mg, aquadest steril, larutan Mayer, minyak imersi, asam sitrat, larutan Dragendroff, DMSO 5%, Mc Farland 0,5%, pereaksi sitoborat, butanol, asam asetat, asetat anhidrat, kloroform.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven dengan suhu rendah dan konstan, alat penyerbuk, *Sterling Bidwell*, timbangan analitik, *vacum rotary evaporator*, alat maserasi, corong, botol cairan penyari, kertas saring, botol maserator, pinset. Alat gelas lain yang digunakan seperti gelas ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, cawan penguap, corong pisah, alat untuk uji kualitatif seperti tabung reaksi, cawan petri.

Alat uji aktivitas antibakteri digunakan adalah autoklaf, inkubator, inkas, jarum ose, tabung reaksi, oven, lampu spiritus, kapas lidi steril, beaker glass, pipet ukur, pinset, dan cawan petri.

D. Jalannya penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama dari penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don) yang dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran sampel daun sente (*Alocasia macrorrhiz* (L.) G.Don) dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada dalam tanaman sente terhadap pustaka dan dibuktikan di Laboratorium Morfologi Sistemika Tumbuhan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Sampel helaian daun sente yang diambil secara acak dengan memilih daun yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, berwarna hijau, segar dan bebas dari hama diambil dari daerah Mojosongo, Kecamatan Jebres, Surakarta, Jawa Tengah.

3. Pembuatan serbuk daun sente

Helaian daun sente yang telah dipetik dari batangnya kemudian dicuci dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang menempel kemudian ditiriskan. Kemudian daun sente basah sebanyak 12 Kg dikeringkan dengan dioven pada suhu 50°C. Daun sente yang telah kering dengan berat 2,2 Kg diserbuk dengan menggunakan mesin penggiling dan diayak dengan menggunakan pengayak No. 40 hingga didapat serbuk daun sente seberat 1,5 Kg.

4. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun sente

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

5. Pembuatan ekstrak daun sente

Metode ekstraksi daun sente yang digunakan pada penelitian ini menggunakan maserasi. Serbuk kering yang digunakan untuk maserasi sebanyak 1,4 Kg dan dimasukkan ke dalam alat maserator, kemudian dituangi dengan 75 bagian larutan penyari (70%). Selama 5 hari dibiarkan dan ditutup, kemudian diletakkan terlindungi dari cahaya sambil berulang – ulang diaduk. Peras ampas kemudian sari diencerkan. Ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian (Depkes RI 1986). Semua hasil maserat dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan evaporator hingga diperoleh ekstrak kental.

6. Penetapan persen rendemen

Persen rendemen diperoleh dari menimbang hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk daun sente kering dan dikalikan 100%

$$\%Rendemen = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{berat serbuk daun sente (Alocasia macrorrhiza(L.)G. Don)}}$$

7. Tes bebas etanol ekstrak daun sente

Tes bebas etanol ekstrak daun sente dilakukan dan dibuktikan di Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Ekstrak diuji etanolnya untuk mengetahui apakah ekstrak daun sente benar-benar bebas dari etanol. Ekstrak daun sente diuji etanolnya dengan melakukan uji esterifikasi etanol menggunakan reagen H_2SO_4 pekat (asam sulfat pekat) dan CH_3COOH

kemudian dipanaskan, hasil uji bebas etanol dalam ekstrak daun sente ditandai dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

8. Fraksinasi ekstrak daun sente

Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang ekstrak kental daun sente sebanyak 10 gram kemudian dilarutkan dengan pelarut air, difraksi 3 kali dengan pelarut *n*-heksana dengan proses fraksinasi dengan corong pisah, fase *n*-heksana terletak di atas dan fase air terletak di bawah. Fraksi *n*-heksana yang didapat dipekatkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 40°C. Residu yang didapat dari fraksi *n*-heksana dilanjutkan fraksinasi 3 kali dengan pelarut etil asetat. Hasil yang didapat adalah fraksi etil asetat yang terletak di atas dan fraksi air dibagian bawah kemudian dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 50°C sedangkan fraksi air dipekatkan dalam penangas air.

9. Uji kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun sente

9.1. Identifikasi alkaloid. Sebanyak 0,5 g bahan uji dilarutkan kemudian disaring, selanjutnya filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditetesi 2 ml pereaksi Dragendrof dan 2 mL pereaksi Mayer pada tiap tabung pengujian yang berbeda. Hasil uji positif dengan pereaksi Dragendrof bila terdapat endapan berwarna jingga (Grag dkk. 2013). Hasil positif untuk Mayer menghasilkan endapan berwarna kuning (Tiwari dkk. 2011).

9.2. Identifikasi flavonoid. Sebanyak 5 mg bahan uji dilarutkan dalam 5 ml air dimasukkan ke dalam tabung reaksi dipanaskan lalu disaring. Filtrat yang didapat di tambah bubuk Mg secukupnya, kemudian ditambahkan 1 mL asam sulfat pekat dan 2 mL etanol. Terbentuk larutan berwarna merah menunjukkan flavonoid (Tiwari dkk. 2011).

9.3. Identifikasi saponin. Sebanyak 0,5 g bahan uji ditambahkan 10 ml air panas dalam tabung reaksi dan dikocok kuat – kuat selama 10 menit. Ekstrak dikatakan mengandung saponin jika terbentuk buih yang mantap ditandai dengan terbentuknya buih setinggi 1 sampai 10 cm (Tiwari dkk. 2011).

9.4. Identifikasi tanin. Sebanyak 1 mg bahan uji dilarutkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 1 mL larutan FeCl₃

10%, lalu dikocok sampai homogen. Biru kehitaman atau hitam kehijauan (Robinson 1995).

9.5. Uji steroid/ sterol. Identifikasi sterol dilakukan dengan cara serbuk, ekstrak dan fraksi ditambahkan dengan kloroform dan di saring. Filtrat ditetesi asetat anhidrat, dididihkan kemudian didinginkan. Tambahkan asam sulfat pekat, hasil positif apabila terbentuk cincin coklat kemerahan (Tiwari *et al.* 2011).

10. Sterilitas

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Cawan petri dan tabung reaksi disterilkan dengan oven pada suhu 170-180⁰C selama 2 jam, sedangkan alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung (Suriawiria 2005).

11. Pembuatan biakan dan suspensi bakteri uji

Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dari biakan murni, diambil beberapa ose steril dan ditanamkan dalam tabung berisi 5 ml medium *Brain Heart Infussion* (BHI) yang kekeruhannya disesuaikan dengan standart *McFarland* 0,5 ekuivalen dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C (Bonang dan Koeswardono 1982).

12. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 berdasarkan koloninya

12.1. Isolasi pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA). Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasi pada cawan petri yang telah berisi media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Penampakan membentuk koloni bulat dan halus dengan permukaan rata dan meninggi serta membentuk pigmen berwarna kehijauan (Jawetz *et al.* 2007).

12.2. Identifikasi biokimia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

12.2.1. Media SIM. Cara identifikasi dengan biakan bakteri diinoulasi pada media dengan cara tusukan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji sulfida (-) untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, yaitu tidak terdapat warna hitam pada media, uji indol (-) yaitu tidak berbentuk warna

merah pada bagian atasnya setelah ditambahkan dengan reagen Erlich, uji motilitas (+) yaitu pertumbuhan bakteri yang menyebar pada media.

12.2.2. Media KIA. Cara identifikasi dengan biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya fermentasi karbohidrat dan sulfida. Hasil K/KS⁻ untuk *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 adalah bagian lereng berwarna merah dituliskan K, bagian dasar berwarna merah dituliskan K, sulfida negatif yaitu tidak terbentuk warna hitam pada media yang ditulis S⁻.

12.2.3. Media LIA. Cara identifikasi yaitu dengan biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil K/KS⁻ untuk, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yaitu lereng akan berwarna ungu ditulis K, dasar berwarna ungu ditulis K, dan sulfida negatif yaitu tidak terbentuknya warna hitam pada media ditulis S⁻

12.2.4. Uji citrat. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru (Volk & Wheller 1990).

12.3. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode pengecatan. Identifikasi yang dilakukan selanjutnya adalah pengecatan Gram. Bakteri yang dicurigai *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada pengamatan koloni, diambil satu ose kemudian dioleskan pada obyek glass. Smear pada objek glass kemudian ditetesi dengan Gram A (larutan kristal violet) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram B (*lugol's iodine*) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi dengan Gram C (etanol 70%) ± 1 menit kemudian dibilas, ditetesi lagi dengan Gram D (Safarin) diamkan ± 1 menit kemudian dibilas. Objek glass yang telah dilakukan pengecatan dilihat dimikroskop (Mulyadi 2011). Hasil bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 digolongkan bakteri Gram negatif dengan warna sel merah.

13. Pengujian antibakteri daun sente secara difusi

Ekstrak etanol fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun sente yang diperoleh diuji secara mikrobiologi dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Pengujian daya antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta. Metode yang digunakan yaitu difusi dengan menggunakan *blank disc* (kertas cakram kosong) diameter 6 mm. Kapas lidi yang steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi suspensi bakteri yang telah sesuai dengan standar *Mc Farland* 0,5 kemudian kapas lidi yang telah mengandung bakteri dioleskan pada media MHA. Setelah olesan bakteri mengering atau berdifusi. Sebanyak 20 µl larutan uji dengan konsentrasi 10%, 20% dan 40% serta larutan kontrol negatif ditetaskan pada kertas cakram steril. Pembuatan konsentrasi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air menggunakan pelarut DMSO 5%. Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya.

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

14. Pengujian antibakteri daun sente secara dilusi

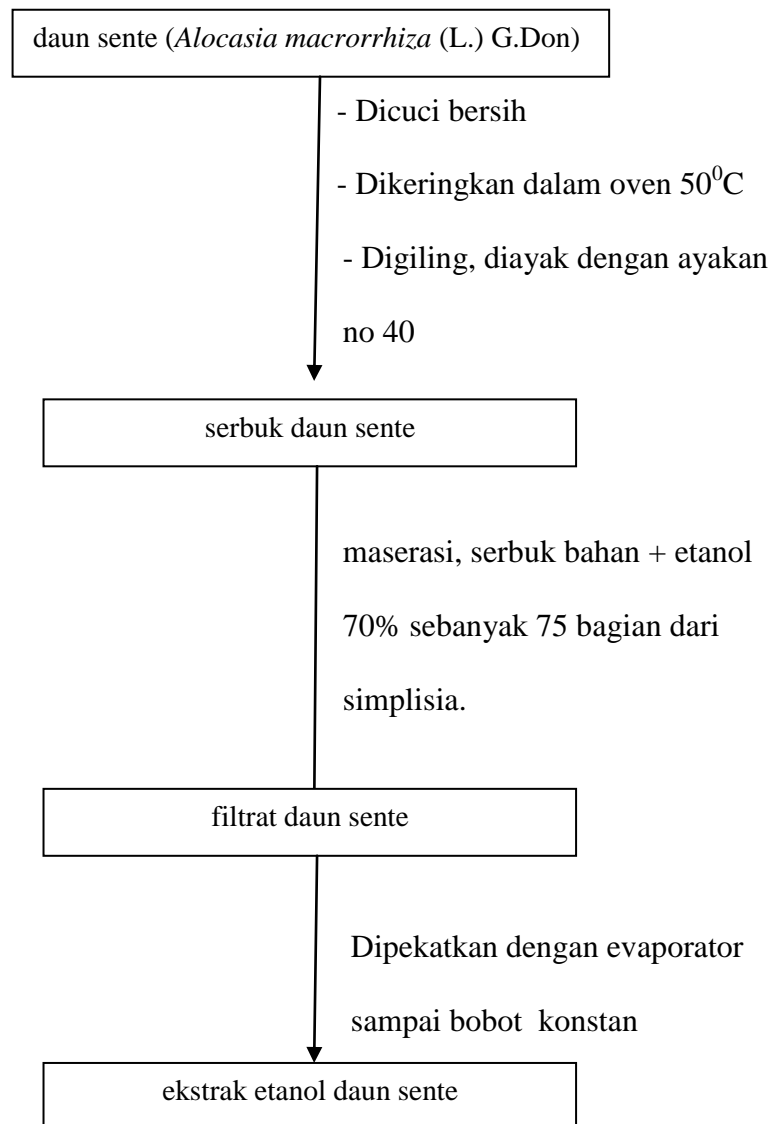
Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh bakteri uji. Metode ini menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 10 tabung steril secara aseptis. Metode ini dilakukan dengan memasukkan bahan uji ke dalam masing-masing tabung reaksi kecuali tabung sebagai kontrol positif dan tabung sebagai kontrol negatif.

Metode ini dilakukan dengan memasukkan bahan uji ke dalam masing – masing tabung reaksi kecuali tabung sebagai kontrol positif dan tabung sebagai kontrol negatif. Pembuatan larutan stok fraksi teraktif menggunakan pelarut DMSO, hal ini disebabkan karena Dimethyl sulfoxide (DMSO) merupakan salah satu pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar, nonpolar. Selain itu, DMSO apabila digunakan dalam penelitian ini tidak akan mempengaruhi hasil penelitian karena pelarut tersebut tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Masing-

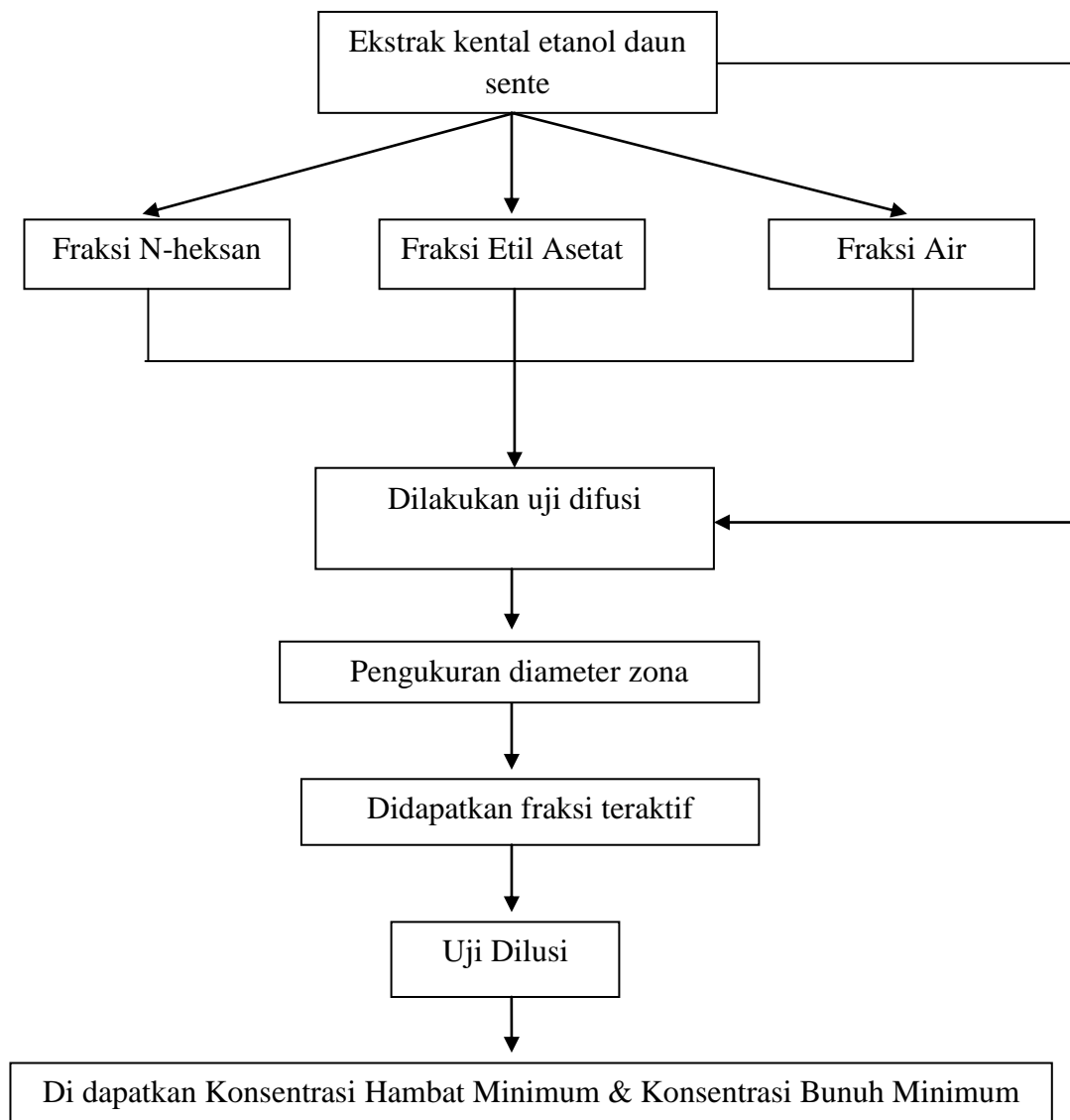
masing tabung tersebut mempunyai beberapa konsentrasi pengenceran yaitu 40%, 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,62%; 0,31%; 0,15%; 0,8%. Medium BHI dimasukkan 0,5 mL ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptis, tabung pertama ditambahkan 0,5 mL dan tabung kedua dimasukkan 0,5 L bahan uji, dari tabung kedua diambil 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung ketiga dan begitu seterusnya sampai tabung kesepuluh. Suspensi bakteri dalam medium *Brain Heart Infusion* (BHI) dimasukkan ke dalam tabung uji sebanyak 0,5 mL. Kontrol negatif terdapat 1 mL suspensi bakteri dan kontrol positif terdapat 1 mL bahan uji. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam, lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi bunuh minimum (KBM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif untuk masing-masing bakteri uji. Bakteri yang sudah digoreskan pada media selektif diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 24-48 jam. Mengamati ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Konsentrasi bunuh minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

E. Analisis hasil

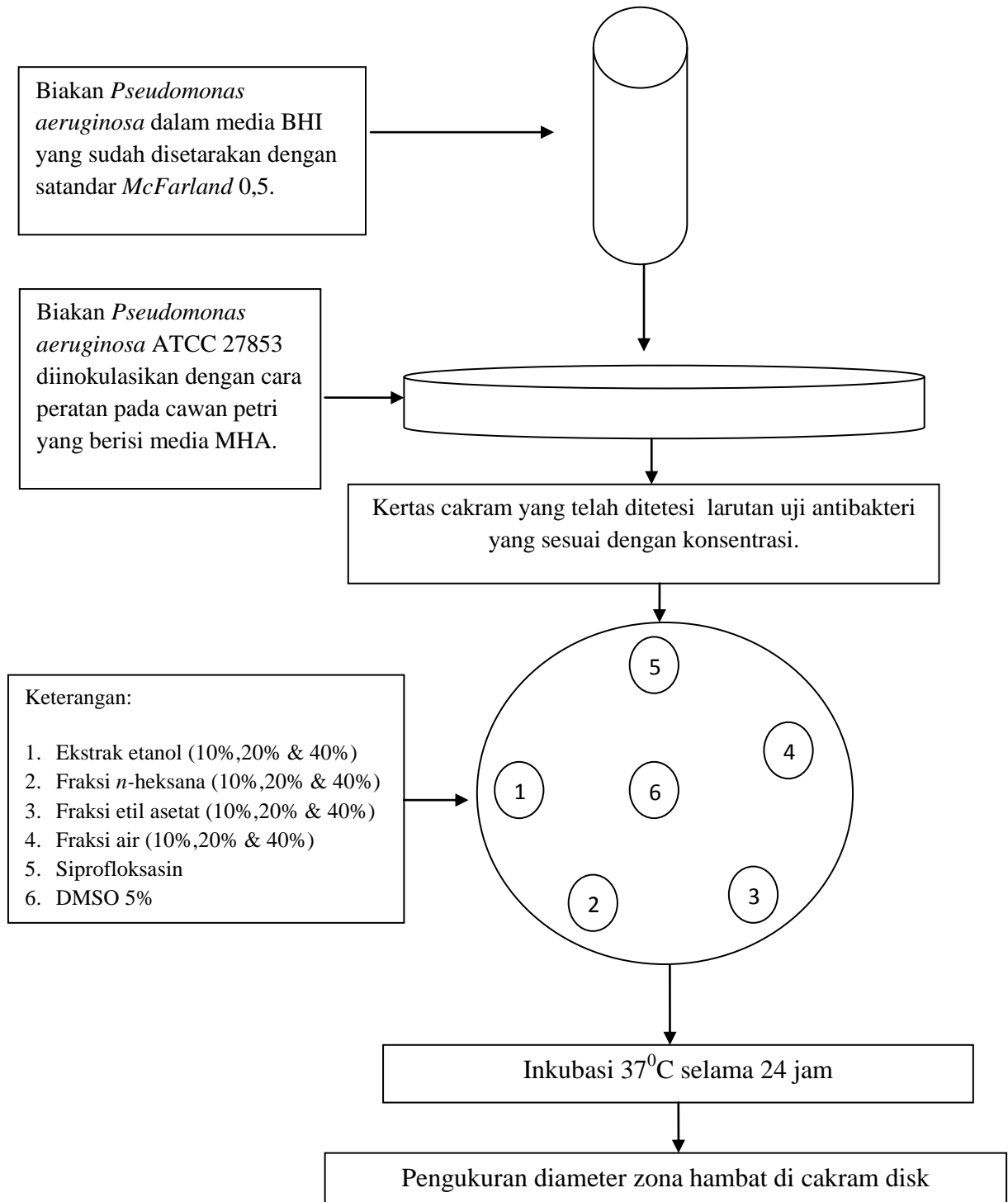
Data aktivitas antibakteri antara fraksi ekstrak etanolik daun sente diuji secara statistik dengan Analisis of Varian (ANOVA) dengan menggunakan *software* SPSS 18 pada konsentrasi yang sama untuk data hasil uji difusi. Metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan metode non parametrik, sedangkan jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA).



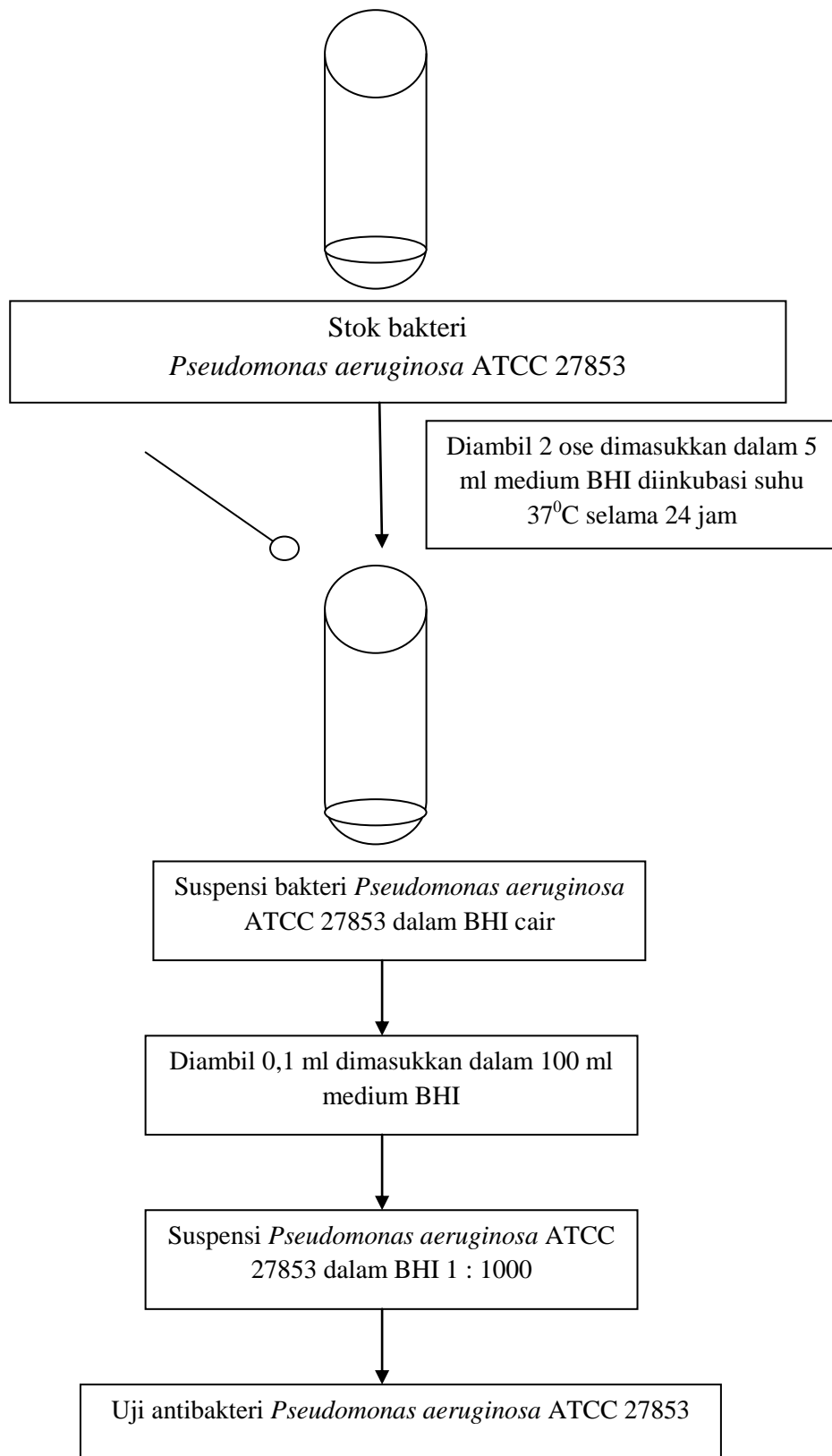
Gambar 3. Skema diagram kerja daun sente secara maserasi.



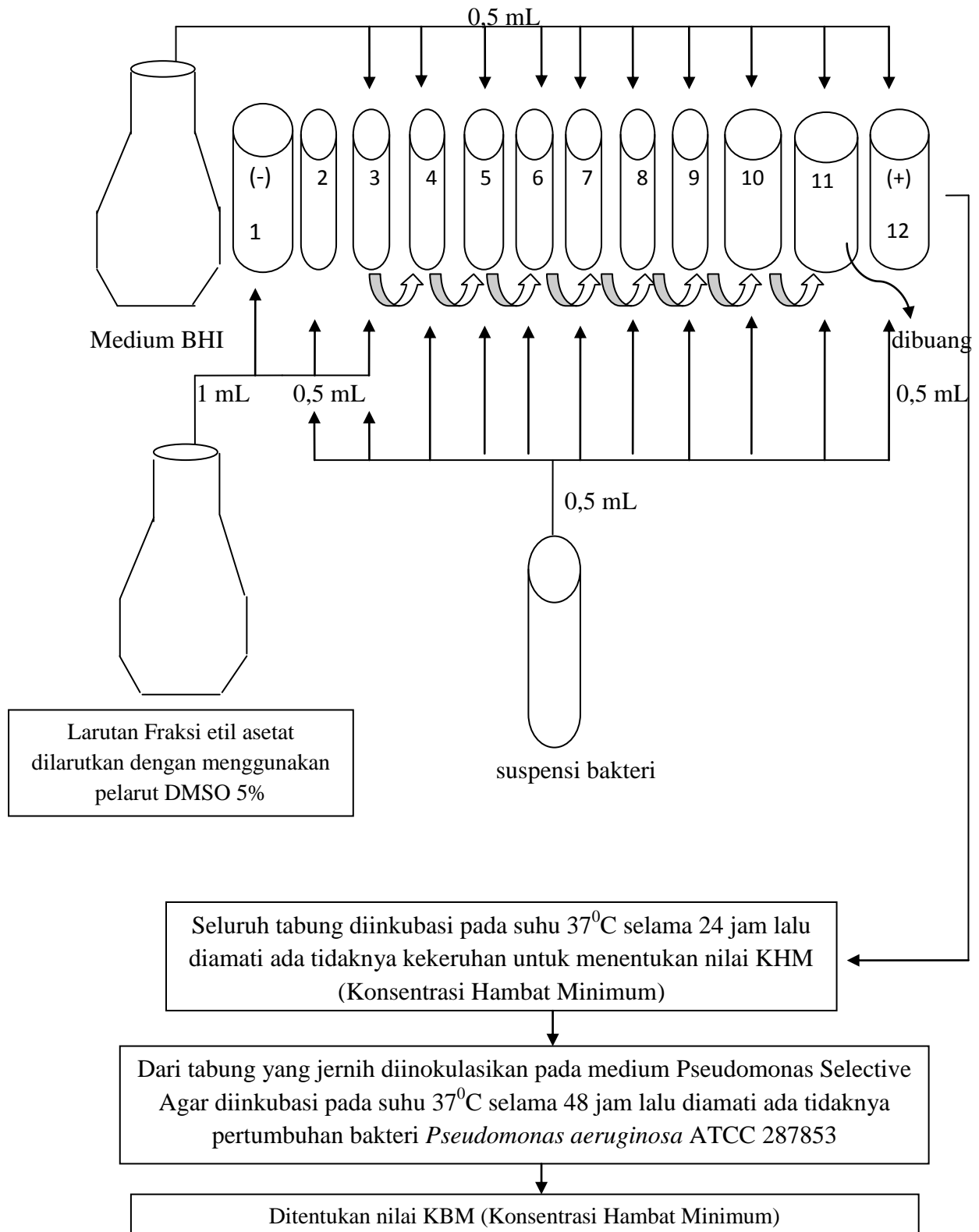
Gambar 4. Skema uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dan dilusi.



Gambar 5. Uji aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



Gambar 6. Bagan kerja pembuatan suspensi bakteri dengan perbandingan 1 : 1000.



Gambar 7. Skema kerja pengujian aktivitas antibakteri fraksi daun sente terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi daun sente

Determinasi tanaman yang dilakukan untuk mengetahui kebenaran dari tanaman sente sebagai obyek penelitian dengan cara mencocokkan ciri dan morfologi pada literatur, serta menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan dan tercampurnya bahan lain. Determinasi dilakukan di unit laboratorium Morfologi Sistematika Tumbuhan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Berdasarkan hasil determinasi tersebut dinyatakan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar – benar tanaman *Alocasia macrorrhiza* (L) G.Don. Dengan hasil kunci determinasi sebagai berikut: 1b – 2b – 3b – 4b – 12b – 13b – 14b – 17b – 18b – 19b – 20b – 21b – 22b – 23a – 24b – 25b – 26b – 27a – 799b – 800b – 801b – 802b – 803b – 804b – 805b. Familia 215. Araceae 1b – 2b – 3b – 5b – 8a – 9a – 10a – 11a – 12a – 13b – 19. *Alocasia* 1a – 2a – 3b. *Alocasia macrorrhiza* (L) G.Don. Sinonim: *A. alba* Schott, *A. bantamensis* Kds, *A. crassifolia* Engl. Hasil determinasi tanaman selengkapnya dapat dilihat pada (Lampiran 1).

2. Pembuatan serbuk daun sente

2.1 Pengambilan daun sente. Tahap awal sebelum dilakukan berbagai uji terhadap helaian daun sente, tanaman tersebut dikumpulkan terlebih dahulu. Pengambilan tanaman seperti bagian tanaman yang akan digunakan, umur tanaman, waktu panen, dan lingkungan tempat tumbuh tanaman sangat berpengaruh terhadap kadar senyawa aktif yang akan diperoleh. Proses pengambilan sampel diambil secara acak dari daun yang masih segar dan hijau yang diperoleh pada bulan Januari 2017 di daerah Mojosongo Kecamatan Jebres, Surakarta, Jawa Tengah.

2.2 Pengeringan daun sente. Helaian daun sente yang telah terkumpul dilakukan pembersihan untuk menghilangkan kotoran – kotoran yang masih menempel pada sampel tanaman seperti tanah, kerikil, rumput, serangga serta

pengotor lainnya. Selanjutnya dilakukan perajangan tujuannya untuk mempermudah proses pengeringan dan penggilingan. Setelah dirajang proses selanjutnya adalah tahap pengeringan, proses pengeringan pada sampel dengan menggunakan alat oven pada suhu 50 °C. Tujuan dari pengeringan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama dan pengeringan juga dapat mengurangi jumlah kadar air yang terdapat pada simplisia sehingga dapat mencegah dari reaksi enzimatik yang menurunkan kualitas simplisia.

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun sente

Bobot Basah (Kg)	Bobot kering (Kg)	Persentase (%)
12	2,2	18,33

Berdasarkan Tabel 1 di atas dapat dilihat bahwa persentase rata – rata hasil pengeringan daun sente didapat 18,33% b/b, hasil perhitungan dapat dilihat di Lampiran 8.

Daun sente yang sudah kering kemudian diserbuk dengan mesin penyerbuk yaitu grinding, kemudian diayak dengan menggunakan ayakan no 40 mesh. Penyerbukan bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan dan memperluas permukaan kontak dengan pelarut sehingga pengekstraksian dapat berlangsung secara efektif.

3 Penetapan kadar air serbuk daun sente

Hasil penetapan kadar air serbuk daun sente dapat diperoleh dengan cara mengukur kadar airnya dengan menggunakan alat *Sterling Bidwell* dengan melihat volume pada skala alat tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar air serbuk daun sente.

Replikasi	Bobot serbuk (g)	Volume air (ml)	Persentase (%)
1	20	1,3	6,5
2	20	1,4	7
3	20	1,3	7
Rata – rata			6,83

Dimana persentase kadar air serbuk daun sente sebesar 6,83%, sehingga dari hasil tersebut kandungan kadar air serbuk daun sente tidak lebih dari 10%. Hasil perhitungan dapat dilihat di Lampiran 9.

Hasil penetapan kadar air ekstrak daun sente dengan menggunakan alat *Sterling Bidwell* dengan melihat volume pada skala alat tersebut dan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar air pada ekstrak daun sente.

Replikasi	Bobot ekstrak (g)	Volume air (mL)	Persentase (%)
1	20	1,8	9
2	20	1,9	9,5
3	20	1,8	9
Rata - rata			9,2

Pada penentuan kadar air ekstrak etanolik daun sente, hasil penentuan rata – rata kadar air ekstrak sebesar 9,2%. Perhitungan kadar air ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 11.

4 Hasil pembuatan ekstrak daun sente

Setelah proses penyiapan simplisia dilanjutkan dengan proses ekstraksi simplisia daun sente. Simplisia yang sudah dalam bentuk serbuk halus diekstraksi dengan menggunakan etanol 70%. Pemilihan proses ekstraksi daun sente dengan menggunakan metode maserasi karena memiliki keuntungan yaitu cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana (Tiwari *et al.* 2011).

Menurut Tiwari *et al.* (2011), etanol lebih banyak menarik senyawa seperti flavonoid, fenol, alkaloid, dan tanin sedangkan saponin lebih banyak terlarut dalam air. Penggunaan etanol 70% dapat menghasilkan suatu bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengotor hanya dengan skala kecil turut dengan cairan pengekstraksi (Voight 1989).

Wadah maserasi yang digunakan berkaca gelap untuk menghindarkan dari sinar matahari langsung. Proses maserasi dilakukan selama 5 hari dengan cara sesekali diaduk dan dilakukan dalam keadaan tertutup agar etanol tidak menguap pada suhu kamar. Filtrat maserasi dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C, keuntungannya adalah dapat mencegah terurai atau rusaknya senyawa

aktif yang tidak stabil terhadap suhu tinggi. Hasil perhitungan rendemen ekstrak daun sente dapat dilihat pada Lampiran 10.

Tabel 4. Hasil persen rendemen ekstrak etanol

Berat serbuk (G)	Berat ekstrak (G)	Rendemen %
1.400	271,6	19,40

Hasil ekstraksi serbuk daun sente dengan persen rendemen sebesar 19,40%. Pemilihan pelarut etanol dalam proses maserasi pada daun sente mempengaruhi banyaknya yang didapat, dikarenakan sifat etanol yang dapat melarutkan hampir semua zat sehingga komponen yang terekstrak semakin banyak (Arifin 2006).

Tabel 5. Hasil uji organoleptis ekstrak daun sente

Identifikasi	Hasil penelitian
Warna	Coklat kehitaman
Bau	Agak Manis
Rasa	Sepat Agak manis

Dilakukan uji organoleptik meliputi bentuk, warna, rasa dan bau yang bertujuan untuk memberikan pengenalan secara objektif, serta digunakan untuk menguji simplisia secara fisik selama penyimpanan yang dapat mempengaruhi khasiat bahan. Hasil uji organoleptik ekstrak etanol daun sente dapat dilihat pada Tabel 5.

5 Hasil tes bebas etanol dan kadar air ekstrak daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don)

Ekstraksi dari daun sente dilakukan uji tes bebas etanol dengan melakukan uji esterifikasi. Dengan tujuan untuk mengetahui ekstrak daun sente benar – benar bebas dari etanol.

Tabel 6. Hasil uji bebas alkohol pada ekstrak daun sente

Tes bebas etanol	Hasil uji
Ekstrak daun sente + H ₂ SO ₄ (pekat) + CH ₃ COOH ₂ dipanaskan	Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol

Berdasarkan Tabel 6 ekstrak daun sente sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 70% dengan ditandai tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

6 Fraksinasi

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan kandungan yang satu dari yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawanya yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa – senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat nonpolar akan masuk ke pelarut nonpolar (Tiwari *et al.* 2011).

Ekstraksi hasil maserasi yang telah dipekatkan kemudian ditimbang 10 gram ekstrak kental daun sente dilarutkan dengan etanol:air (70:5) v/v dan kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebanyak 75 mL, dilanjutkan dengan pelarut semi polar menggunakan etil asetat dan residu akhir sebagai fraksi air dilakukan sebanyak 3 kali. Hasil fraksinasi ekstrak daun sente seperti pada Tabel 7.

Tabel 7. Persentase rendemen hasil fraksinasi

Bobot Ekstrak (g)	Pelarut	Berat fraksi (g)	Persentase Rendemen (%)
150	<i>N</i> -heksana	5,70	3,80
	Etil asetat	5,20	3,46
	air	98,15	65,43

Perhitungan persentase rendemen fraksi *n*-heksana daun sente didapat prosentase 3,80%. Residu dari fraksi *n*-heksana dipisahkan di corong pisah dengan menambahkan etil asetat 75 mL, sehingga didapat fraksi etil asetat dan air. Perhitungan prosentase rendemen fraksi etil asetat sebesar 3,46% sedangkan persentase rendemen fraksi air sebesar 65,43%. Perhitungan rendemen fraksi dapat dilihat pada Lampiran 12.

Hasil fraksinasi menunjukkan adanya perbedaan persen rendemen dengan bobot fraksi air yang memiliki persen rendemen paling besar diantara fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat. Perbedaan hasil fraksinasi dimungkinkan oleh adanya perbedaan keporan dari masing – masing golongan senyawa kimia. Fraksi air memiliki kepolaran paling tinggi diantara kedua fraksi lainnya, fraksi air berperan dalam menarik senyawa kimia yang bersifat polar. Fraksi *n*-heksana menarik

senyawa – senyawa yang bersifat non-polar. Sedangkan fraksi etil asetat adalah pelarut yang semi polar, mudah terbakar dan mudah menguap (Harborne 1987). Faktor lain yang mempengaruhi persen rendemen fraksi adalah kemungkinan sebagian besar senyawa dalam daun sente bersifat polar. Hasil rendemen yang diperoleh jauh dari yang diharapkan yaitu 100% atau mendekati 100%. Hal ini kemungkinan disebabkan ekstrak banyak yang menempel pada wadah dan corong.

7 Hasil uji kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun sente

Uji kandungan kimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder yang tersari di dalam ekstrak etanol 70% *Alocasia macrorrhiza* L. (G.) Don, sehingga dapat diketahui metabolit sekunder yang berpotensi memiliki aktivitas antibakteri.

Tabel 8. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun sente.

Kandungan kimia	Hasil		Pustaka	Hasil	
	Serbuk	Ekstrak		Serbuk	Ekstrak
Alkaloid	Endapan jingga	Endapan jingga	Dragendrof : endapan berwarna jingga Mayer : endapan berwarna kuning (Tiwari dkk. 2011)	+	+
Flavonoid	Jingga atau kemerahan	kemerahan	Terbentuk larutan berwarna merah (Depkes RI 2011)	+	+
Saponin	Buih tetap setinggi 1 cm	Buih tetap setinggi 1 cm	Terbentuk buih yang mantap ditandai dengan buih setinggi 1 sampai 10 cm (Tiwari dkk 2011)	+	+
Tanin	Hitam kehijauan	Hitam kehijauan	warna hijau, merah, ungu, biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan, hijau biru menunjukkan adanya polifenolat (Robinson 1995, Kinghorn 2006).	+	+
Steroid/ Sterol	Cincin coklat kehijauan	Cincin coklat kehijauan	cincin coklat kemerahan (Tiwari <i>et al.</i> 2011).	+	+

Keterangan :

(+) : ada senyawa

(-) : tidak ada senyawa

Berdasarkan Tabel 8 di atas menunjukkan bahwa identifikasi yang telah dilakukan pada serbuk dan ekstrak daun sente mengandung senyawa kimia saponin, alkaloid, tanin, flavonoid dan steroid/terpenoid hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kandungan dari tanaman sente mengandung steroid, alkaloid, tanin, polifenol, flavonoid dan saponin (Rohaman 2015, Mubeen *et al* 2012).

Hasil identifikasi senyawa kimia juga dilakukan pada fraksi daun sente yang mengandung senyawa lebih sedikit dibandingkan dengan serbuk dan ekstrak dari daun sente. Hal ini dikarenakan prinsip dari fraksinasi yang memisahkan senyawa berdasarkan polaritasnya. Fraksi *n*-heksana daun sente mengandung senyawa non polar yaitu tanin dan steroid, sedangkan fraksi etil asetat menarik senyawa semipolar yaitu flavonoid, polifenol, alkaloid, dan fraksi air mengandung senyawa polar yaitu tanin/polifenol, flavonoid dan saponin. Hasil identifikasi kandungan kimia pada fraksi dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil identifikasi kandungan kimia fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak daun sente

Kandungan kimia	Hasil			Keterangan		
	<i>n</i> -heksan	Etil asetat	air	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	air
Alkaloid	Mayer : Endapan hijau Dragendroff : endapan hijau tua	Mayer : ada endapan putih kekuningan Dragendroff : jingga kecoklatan.	Mayer : endapan putih kekuningan Dragendroff : jingga	-	+	+
Flavonoid	Hijau muda	Warna merah	Warna merah bata	-	+	+
Saponin	Tidak terbentuk busa	Tidak terbentuk busa	Terbentuk busa	-	-	+
Tanin/ Polifenol	Hijau muda	Warna coklat	Hitam	-	+	+
Steroid/ Sterol	Terbentuk cincin coklat kemerahan	Terbentuk cincin hijau kecoklatan	Hitam	+	+	-

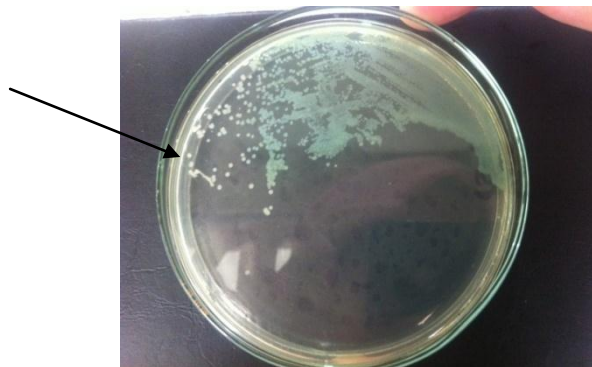
Keterangan : (+) : ada senyawa
(-) : tidak ada senyawa

8 Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dari biakan murni, diambil beberapa ose steril dan ditanamkan dalam tabung berisi 5 ml medium *Brain Heart Infusion* (BHI) yang kekeruhannya disesuaikan dengan standart *McFarland* 0,5% ekuivalen dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C (Bonang dan Koeswardono 1982).

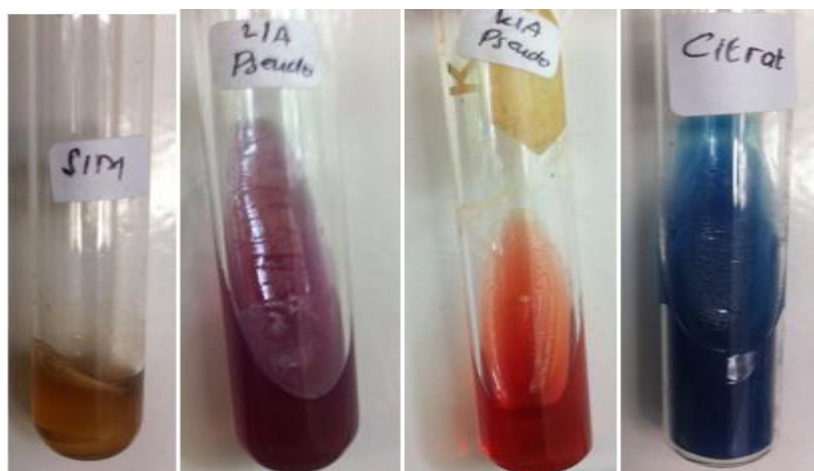
8.1. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara goresan. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasikan pada medium *PSA* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan penampakan koloni yang berwarna hijau kebiruan yang dihasilkan dari pigmen *pyocyanine*, koloni berbentuk bulat dan halus.

Koloni *Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 8. Hasil koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada media *PSA* (*Pseudomonas Selective Agar*).

8.2. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara biokimia. Hasil identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara biokimia dapat dilihat dari Tabel 9 dan Gambar 9.



Gambar 9. Hasil uji biokimia *Pseudomonas aeruginosa*

Tabel 10. Hasil identifikasi uji biokimia pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Penguji	Pustaka (Volk & Wheller 1990)	hasil
SIM	- - +	- ++
KIA	K/K S ⁻	K/K S ⁻
LIA	K/K S ⁻	K/K S ⁻
Citrat	+	+

Keterangan :

SIM = Sulfide Indol Motility

LIA = Lysin Iron Agar

KIA = Kligler Iron Agar

+

= reaksi positif

- = reaktif negatif

A = Acid (Asam)

K = Alkali (basa)

S = Sulfide

G = Gas

N = Netral

Hasil pengujian pada media *Sulfide Indol Motility* (SIM) untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas. Pengujian dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil yang didapat adalah --+ yang artinya *Pseudomonas aeruginosa* tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan *hydrogen sulfide* sehingga media tidak berwarna hitam. Uji indol dibuktikan dengan menambahkan 3 tetes reagen *Erlich* A dan B, pada permukaan media tidak terbentuk warna merah muda yang berarti uji indol negatif, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak membentuk cincin indol karena tidak terjadi pemecahan asam amino tripton oleh enzim triptonase yang menjadi indol dan

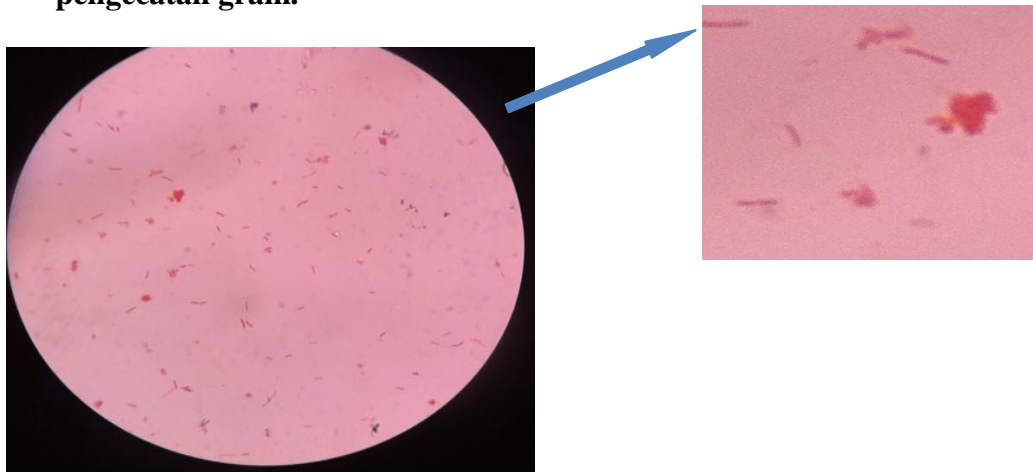
asam piruvat. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak memakai tripton sebagai salah satu sumber karbon sehingga tidak terjadi reaksi antara indol dan paradimetil amino bensaldehid yang akan membentuk rosindol yang berwarna merah. Uji motilitas positif yang ditunjukkan dengan penyebaran di media SIM karena terlihat adanya penyebaran di sekitar bakteri daerah inokulasi, hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasi yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagel.

Hasil pengujian pada media *Klinger Iron Agar* (KIA) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Pengujian dengan media KIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil K/K S⁻. Hasil K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna merah, yang menunjukkan bahwa bakteri tidak memfermentasi glukosa dan laktosa. Hasil S⁻ artinya H₂S negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media, karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S. H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam. Medium KIA mengandung 1% laktosa, 0,1% glukosa dan *phenol red* sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam. Media KIA juga mengandung sodium thiosulfat yaitu susunan untuk menghasilkan H₂S.

Medium *Lysin Iron Agar* (LIA) untuk mengetahui deaminase lisin dan sulfida. Pengujian dengan LIA setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil K/K S⁻. Hasil K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendeakarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa sehingga berwarna ungu di seluruh media, karena warna pembenihan ini mengandung bromkresol ungu dari warna coklat menjadi warna ungu. Hasil S⁻ artinya uji H₂S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S. H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam.

Hasil pengujian pada media citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian dengan medium citrat setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan hasil positif ditandai dengan adanya warna biru pada media citrat. Hal ini karena *Pseudomonas aeruginosa* mampu menggunakan citrat sebagai sumber karbon maka menyebabkan suasana menjadi basa sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru karena pada medium citrat terdapat BTB (Bromo Thymol Blue) yang merupakan indikator pH. Hasil uji identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada Lampiran 7.

8.3. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* metode pengecatan gram.



Gambar 10. Hasil identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* secara mikroskopis.

Pengecatan Gram bertujuan untuk mengetahui bakteri tergolong Gram positif atau Gram negatif. Hasil pengecatan Gram menunjukkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* termasuk gram negatif. Dimana dinding pada bakteri Gram negatif terdapat lipopolisakarida, sehingga alkohol dapat merusak lapisan lipopolisakarida tersebut. Komplek *crystal violet* – *iodin* dari Cat Gram A dan B pada Gram negatif dapat tercuci dan menyebabkan sel bakteri tampak transparan, yang menyebabkan bakteri berwarna merah setelah diberi safranin yang merupakan pewarna basa berwarna merah (Pratiwi 2008). Hasil pengecatan Gram dilihat dibawa mikroskop dengan perbesaran 100 x. Hasilnya berbentuk batang, satu – satu atau bergerombol dan berwarna merah.

9 Hasil uji antibakteri daun sente secara difusi dan dilusi

Uji antibakteri bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri terhadap ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun sente. Pengujian aktivitas dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi menggunakan metode difusi yaitu dengan mengetahui diameter daerah hambat pertumbuhan dari biakan bakteri uji.

Pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi daun sente dilakukan terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan konsentrasi larutan 40%, 20% dan 10% serta kontrol negatif DMSO 5% dan kontrol positif siprofloksasin.

Pembuatan suspensi bakteri uji disesuaikan dengan kekeruhan modifikasi standart *Mc farland* 0,5%. Masa inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Pengujian secara difusi menggunakan cakram dengan ukuran 6 mm. Daerah hambat yang terbentuk ditunjukkan dengan lingkungan bening di sekitar cakram yang berisi larutan uji (Rostiana 2007). Perhitungan konsentrasi larutan dapat dilihat pada Lampiran 13.

Kontrol positif yang digunakan yaitu siprofloksasin dalam bentuk cakram disk 5 µg, hasil ditunjukkan dengan adanya zona bening yang ditimbulkan di sekeliling cakram siprofloksasin.

Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5% hasil yang ditunjukkan tidak adanya zona bening yang terbentuk pada uji diameter zona hambat Lampiran 14. Hal ini menandakan bahwa DMSO 5% tidak berpengaruh terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri.

Pengamatan dilakukan setelah 1x24 jam masa inkubasi. Hasil pengukuran rata – rata diameter zona hambat ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun sente terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah seperti Tabel 11.

Tabel 11. Hasil diameter zona hambat ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun sente

Sediaan uji	Konsentrasi	Diameter daya hambat (mm)			Rata – rata (mm)
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	40%	8	9	10	9,00
	20%	12	10	13	11,67
	10%	9	7	8	8,00
Fraksi <i>n</i> -heksana	40%	0	0	0	0,00
	20%	0	0	0	0,00
	10%	0	0	0	0,00
Fraksi etil asetat	40%	14	16	15	15,00
	20%	10	11	12	11,00
	10%	10	9	11	10,00
Fraksi air	40%	11	12	11	11,33
	20%	8	7	10	8,33
	10%	8	7	9	8,00
Kontrol negatif	5%	0	0	0	0,00
Kontrol positif	5µg	28,33	29	27	28,11

Keterangan : K - : (Kontrol negatif) DMSO

K + : (Kontrol positif) Siprofloksasin

Pada Tabel 11 menunjukan daerah zona hambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada ekstrak daun sente dengan konsentrasi 40%, 20% dan 10% berkisar antara 7 – 13 mm dan pengujian aktivitas fraksi etil asetat menunjukkan hambatan pertumbuhan konsentrasi 40%, 20% dan 10% berkisar antara 9 - 17 mm. Pada fraksi air memiliki zona hambat pada konsentrasi 40%, 20% dan 10% berkisar antara 7-13 mm. Sedangkan pada pengujian aktivitas ekstrak *n*-heksana tidak terlihat zona bening di sekitar kertas cakram.

Data ANOVA diameter zona hambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan nilai signifikansi 0,000 ($P < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan signifikansi pengaruh perlakuan yang diberikan pada bakteri uji. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol positif, ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air

daun sente dengan konsentrasi 40%, 20% dan 10% memberikan aktivitas yang menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Pada Tabel *Homogeneous Subsets* ini untuk mencari grub/subset mana saja yang mempunyai perbedaan rata – rata yang tidak berbeda secara signifikan. Terlihat bahwa diameter zona hambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terhadap kontrol negatif, menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kontrol positif dengan ekstrak, fraksi etil asetat, dan fraksi air. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5% yang menunjukkan tidak adanya zona bening. Hal ini mengindikasikan bahwa kontrol negatif yang digunakan tidak berpengaruh pada uji antibakteri.

Kontrol positif menunjukkan perbedaan yang nyata dalam uji *Tukey*, karena menghasilkan aktivitas antibakteri yang paling besar terhadap bakteri uji dibandingkan dengan kontrol negatif serta berbagai konsentrasi pada ekstrak dan fraksi. Antibiotik yang digunakan sebagai pembanding atau kontrol positif adalah siprofloksasin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diameter zona hambat yang dibentuk oleh siprofloksasin pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* untuk rata – rata 3 kali replikasi sebesar 28,33 mm; 29,00 mm dan 27,00 mm. Target antibiotik siprofloksasin adalah DNA girase bakteri dan topoisomerase IV. Topoisomerase IV adalah target primer untuk sejumlah bakteri gram-negatif. Siprofloksasin menghambat gulungan (supercoiling) DNA yang diperantarai oleh girase pada konsentrasi yang berhubungan dengan kerja antibakteri efektifnya (Goodman & Gilman 2010).

Efek antibakteri yang paling baik terlihat pada fraksi etil asetat dengan konsentrasi 40% terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil tersebut diduga disebabkan oleh adanya kandungan senyawa semipolar di fraksi etil asetat yang lebih optimum dibandingkan senyawa di dalam fraksi *n*-heksana, fraksi air, dan ekstrak daun sente dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753, sehingga diduga aktivitas antibakteri yang efektif dari fraksi etil asetat adalah alkaloid, flavonoid dan steroid. Hal ini sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa senyawa kimia yang berpotensi sebagai

antibakteri adalah steroid, alkaloid, tanin/polifenol, flavonoid dan saponin (Rohman 2015; Mubeen *et al.* 2012).

Berdasarkan hasil identifikasi kandungan senyawa kimia fraksi etil asetat mengandung senyawa alkaloid, flavonoid dan steroid. Senyawa flavonoid merupakan golongan senyawa fenolik, yang diduga mekanisme kerjanya dengan mendenaturasi protein sel dan merusak membran sel mikroorganisme. Suatu substansi yang dapat mendenaturasi protein dan merusak sel tanpa dapat diperbaiki lagi (*irreversible*) sehingga pertumbuhan mikroba terganggu (Rinawati 2011). Mekanisme kerja steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada lapisan liposom (Madduluri 2013). Sedangkan Alkaloid dapat mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak berbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian bakteri (Poeloengan dkk 2010).

Pengujian aktivitas antibakteri selanjutnya yang akan dilakukan adalah metode dilusi atau uji seri pengenceran. Metode ini dipilih karena selain dapat menentukan ada tidaknya kemampuan antibakteri pada fraksi teraktif yaitu fraksi etil asetat dari daun sente juga dapat menentukan besar Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) terhadap bakteri uji. Pembuatan larutan uji fraksi etil asetat dilarutkan dengan DMSO 5% dengan seri konsentrasi yang dibuat untuk pengujian antibakteri adalah 40%; 20%; 10%; 5%; 1,25%; 0,625%; 0,313%; 0,156% dan 0,078%. Kontrol positif berupa bakteri uji dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kontrol negatif berupa fraksi etil asetat.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilihat dari kejernihan pada tabung yang menunjukkan bahwa pada tabung konsentrasi tertentu dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil KHM daun sente tidak dapat ditentukan karena tertutupi oleh kekeruhan ekstrak dan fraksi yang digunakan. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menunjukkan adanya daya antibakteri fraksi etil asetat yang dapat dilihat dari pengujian fraksi etil asetat terhadap bakteri uji pada tabung yang kemudian diinokulasikan pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA). Dengan dilihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853 pada media PSA. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara dilusi seperti Tabel 12.

Tabel 12. Hasil aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun sente terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Konsentrasi (%)	Fraksi Etil Asetat		
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III
Kontrol negatif (-)	-	-	-
40%	-	-	-
20%	-	-	-
10%	+	+	+
5%	+	+	+
2,5%	+	+	+
1,25%	+	+	+
0,625%	+	+	+
0,3125%	+	+	+
0,156%	+	+	+
0,078%	+	+	+
Kontrol positif (+)	+	+	+

Keterangan :

(-): tidak ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (-) : Fraksi etil asetat

(+): ada pertumbuhan bakteri

Kontrol (+) : Suspensi bakteri

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah fraksi etil asetat daun sente pada konsentrasi 20% .Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memiliki daya tahan yang kuat terhadap lingkungan fisik dan bahan kimia daripada bakteri lain. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memproduksi eksopolisakardia (EPS) berupa alginat yang berbentuk gel kental di sekeliling bakteri. Alginat memungkinkan bakteri untuk membentuk biofilm, yaitu kumpulan koloni sel – sel bakteri yang menempel pada suatu permukaan (Mpila dkk 2012). Menurut Todar (2009), kecenderungan berkolonisasi dalam bentuk biofilm membuat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tahan terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lain.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanolik daun sente (*Alocasia macrorrhiza* L.(G.) Don.) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* 27853 dapat disimpulkan bahwa:

Pertama, ekstrak etanol dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat dan air) dari daun sente (*Alocasia macrorrhiza* L.(G.) Don) mempunyai aktivitas antibakteri dimana fraksi etil asetat merupakan fraksi teraktif dalam menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* 27853.

Kedua, fraksi etil asetat mempunyai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 20% terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* 27853.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang isolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun sente (*Alocasia macrorrhiza* L.(G.) Don) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* 27853.

DAFTAR PUSTAKA

- Agromedia. 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat*. Penyunting Agung dan Tinton-Cet.1,-Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Agustina, LC. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi *n*-heksana, Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Air dari Ekstrak Etanolik Daun Sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.)G. Don) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, [SKRIPSI]. Surakarta: Fakultas Farmasi. Universitas Setia Budi.
- Ansel HC. 2005. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Ed ke-4. Faria I, penerjemah; Jakarta: UI Press. Terjemahaan dari : *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery*. Hlm 217 – 218.
- Ardananuridin AS, Winarsih, Winayat M. 2004. Uji efektivitas dekok bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella thypi* secara in vitro. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 20:1.
- Arifin, H., Anggraini, N., Handayani, D. Dan R asyid R. 2006. Standarisasi Ekstrak Etanol Daun *Eugenia Cumini* Merr. *J. Sains Tek. Far.* 11:88-93.
- Bauman R. 2007. *Microbiology With Disaese by Taxonomy*. Ed ke-2. San Fransisco: Person Educating Inc.
- Bamford KB, Gillespie SH. 2007. *At a Glance Mikrobiologi Medis dan Infeksi*. Ed ke-3. Jakarta :Erlangga. Hlm 56-57.
- Bonang G., Koeswardono. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium Dan Klinik*. Jakarta: PT. Gramedia. Hlm 9, 77-78,176-191.
- Dalimartha S.2005. *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Diabetes Melitus*.Bogor:Penebar swadaya.
- Darmadi. 2008. *Infeksi Nosokomial: Problematika dan Pengendaliannya*. Jakarta: Salemba Mediaka. hlm.80-81.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan RI.1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan RI.1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan RI.1995. *Materi Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- [DEPKES RI]. 1999. *Good Laboratory Practices*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan RI. 2008. *Pengelolaan Pasca Panen Obat*. Balai Penelitian Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tubuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dianasari N.2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysentri* serta bioautografi [skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Grag, Rachna, Devihalli; Chikkarah dan kinagandhur Manjunath. 2011. In Vitro Antibakterial Activity and Phytochemical Analysis of Some Traditional Herbs. *International Journal of Pharma and Bio Science* : 994-1001.
- Goodman & Gilman. 2010. *Dasar Farmakologi Terapi*, editor Joel G. Hardman, Lee E. Limbird. Edisi 10. Jakarta, EGC, HAL 681.
- Gunawan D dan Muyani S. 2004. *Ilmu Obat Alam*. Jilid I. Jakarta : Penebar swadaya, hlm 9-13.
- Gupte, S. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Alih bahasa : Suryawidajaja, J.E., Penerbit bina Rupa Aksara. Jakarta Hal; 20-24, 55, 82-85, 179-185, 262-265, 286-288.
- Hadioetomo RS. 1985. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta: Gramedia.
- Harbone JB. 1987. *Metode Fitokimia Penentuan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah; Niksolihin S, editor. Bandung : ITB.
- Harbone JB. 2006. *Metode Fitokimia*. Edisi ke-2. Kosasih Padmawinata dan Iwang soediro, penerjemah; Bandung: ITB Press. Terjemah dari: *Phytochemical Methods*.
- Herbert RB. 1995. *Biosintesis Metabolit Sekunder*. Semarang: IKIP Semarang Press.
- IFPDD (Indonesia Forum of Parliementarians on Population and Development). 2012. Globalisasi dan Kualitas Penduduk Indonesia.

- Irene E, Rieuwpassa, Muliaty Yunus, I Wayan Suka Arsana. 2011. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* dan tes sensitivitas siprofloksasin pada abses periodontal. Vol. 10: 151-155.
- Jawetz E, Melnick KL, Adelberg EA. 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Ed ke-16. Bonang G. Penerjemah; Jakarta; EGC. Terjemahaan dari: *Review of Medical Mikrobiology*. Hlm 58-63, 291-292,303-306.
- Jawetz E, Melnick J.L, Adelberg E.A. 2005. *Medical Microbiology*. 23 th Ed. Elferia Nr, Penerjemah : Jakarta. hlm 170, 229.
- Jawetz E, Melnick J.L, Adelberg E.A.. 2007. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Bonang G, Penerjemah; Jakarta: EGC. Terjemah dari: *Medical Microbiologic*. Hlm: 291-292.303-306.
- Jawetz E, Melnick J.L, Adelberg E.A. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Joshi A, Bhag S.K, Jai P.N, Veena S. 2015. *Alocasia macrorrhiza*: A decorative but Dangerous Plant. *International Journal of Scientific Study*. DOI : (Vol. 3) 10. 17354/2015/193.
- Katzung, B.G. 2007. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Ed ke-5. Dripa Sjabana, penerjemah; Jakarta: EGC. Terjemahan dari: *Basic and clinical pharmacology*. Hlm 779-787, 857.
- [Kementrian Kesehatan RI]. 2013. Suplemen III *Farmakope Herbal Indonesia* edisi I. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 100-101.
- Khopkar SM. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press
- Madduluri, Suresh R, Babu K, Sitaram B. 2013. In vitro evaluation of antibacterial activity of five indegenous plants extract againts five bacterial pathogens of human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 5(4):679-684.
- Mayasari E. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* : Karakteristik, Infeksi dan Penggunaan. <http://library.usu.ac.id>. [24 Desember 2014].
- Mpila A. Deby, Fatimawali, Weny I. Wiyono. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*Coleus atropurpureus* [L] Benth) Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado.
- Mubeen US, Vimlesh M, Santanu B. 2012. Laxative and diuretic property of ethanolic extract of leaves of *Alocasia macrorrhiza* linn. On experimental albino rats. *International Research Journal of Pharmacy* 2:174-176.


- Mudihardi *et al.* 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Surabaya: Salemba Medika. Hlm: 318-320.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*. Volume VII No. 2.
- Mulla WA, Sargade PB, Pawar AM, Tarkasband HA, Sayyad FJ. Antimicrobial activity of *Alocasia indica*. *Int J Pharm Tech Res*. 2010; 2: 327-33.
- Peoloengan M, Chairul, Iyep K, Susan MN. 2006. Aktivitas antimikroba dan fitokimia dari beberapa tanaman obat. *Jurnal MIPA* 35(2): 165-174
- Pleczar MJ, Chan ECS. 1998. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. Jilid 2. Hadisoetomo RS, Imam T, angka SL, penerjemah; Jakarta: UI-Press. Terjemahan dari: *Elements of Microbiology*.
- Pratiwi, Sylvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga. Hlm 188.
- Priyanto. 2008. *Farmakologi Dasar untuk Mahasiswa Keperawatan dan Farmasi*. Depok : Lembaga studi dan konsultasi Farmakologi.
- Putra ABW. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri ekstrak Kloroform Kelopak Roselia (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) terhadap *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus* uji bioautografi [skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Rahmawati F, & siti, H.B. 2014. Studi Aktivitas Antibakteri Sari Daun Binahong (*Anredera cardifoba*) terhadap pertumbuhan *Bacillus cereus* dan *Salmonella enteroditis*. *J.Lif.Sci*. 3(2) :103-111.
- Rao, Sridar P.N. 2008. *Sterlization and Desinfection*. Davangere: Departemen Of Microbiology.
- Rinawati ND. 2011. Daya Antibakteri tumbuhan majapahit (*Crescentia cujete* L.) terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* [Tugas Akhir]. Surabaya: Program Studi Biologi. ITS.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Padmawinata K, Penerjemah; Bandung: ITB Press. Terjemahan dari: *The Organic Constituents of Higher Plants*. Hlm: 71-75.
- Rohman A. 2015. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Etanol Daun Sente (*Alocasia macrorrhizae* (L.)G Don) dengan Variasi Cara Pengeringan. *Seminar kimia*. [SKRIPSI]. Surakarta: Fakultas keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Sebelas Maret.
- Romeo C, Ongpoy Jr. 2015. Phytochemical Screening and Antimicrobial Study Of The Different Leaf Extracts Of *Alocasia sanderiana* Bull., An

Endemic Philippine Plant. *International journal of scientific & technology research*. Volume 4. ISSN 2277-8616.

- Rostiana. 2007. Uji Aktivitas Hasil Penyarian Biji Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa*) Terhadap Beberapa Mikroba Penyebab Infeksi Kulit [KTI]. Bandung: Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran.
- Saepudin, Rihal YS, Suci H. 2007. Perbandingan penggunaan antibiotik pada pengobatan pasien infeksi saluran kemih yang menjalani rawat inap di salah satu RSUD di Yogyakarta tahun 2004 dan 2006 [skripsi]. Yogyakarta: Fakultas MIPA Jurusan Farmasi. Universitas Islam Indonesia.
- Sari DRAP, Yustiantara PS, Paramita NLPV, Wirasuta IMAG. 2011. Uji Aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah lada hitam (*Piper nigrum* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* [skripsi]. Bali: Fakultas Farmasi, Udayana.
- Srivastava V, Sheikh Mubeen, Bhupesh Chand Semwal, Vimlesh Misra. 2012. Biological Activities Of *Alocasia macrorrhiza* : Review. Departemen of Pharmacology. Institute of Pharmaceutical Research, GLA University, Chaumuhan Mathura 281406. India.: ISSN -2277-1883.
- Sumarsih S. 2003. *Mikrobiologi Dasar*. Yogyakarta : Universitas Pembangunan Nasional Veteran.
- Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Papas Sinar Sinanti.
- Tiwari P, Bimlesh K, Mandeep K, Gurpreet K, Harleen K, editor. 2011. Skrining fitokimia dan ekstraksi. *Internationael pharmaceutica Scientia* 1 (1).
- Todar, K. 2008. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Available from <http://www.textbookofbacteriology.net>.
- Ulung G, Wahyu A. 2014. *Buku 493 Resep ramuan herbal Berkhasiat*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- Voigt R.1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi V. Noerono S, penerjemah. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Terjemahan dari: *Pharmaceutical Technology*.
- Volk WA, Wheeler MF. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Markham, penerjemah; Adisoemarti S, editor. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: *Basic Microbiology*. Hlm 97, 331-335.
- Waghorn GC & WC McNabb. 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 62:383-392.

- Waluyo L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Edisi Pertama. Universitas Muhamadiyah Malang : UMM Perss. Hal 197-198.
- Wibowo M.H, Wahyuni, A.E.T.H. 2008. Studi Patogenesisitas *Escherichia coli* Isolat unggas pada ayam peaging umur 15 hari. *J.Vet.Universitas Udayana*: 9(2): 87-93.
- Wijayakusuma H, Wirian AS, Dalimartha S. 1992. *Tanaman Berkhasiat Obat Indonesia*. Jilid II. Jakarta : Pustaka Kartini.

Lampiran 1. Surat keterangan melakukan determinasi tanaman sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don).



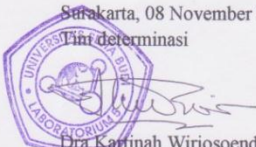
UPT- LABORATORIUM

No : 109/DET/UPT-LAB/08/XI/2016
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Dita Sulistyaningrum
NIM : 19133747 A
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don.)**
Determinasi berdasarkan : Backer : Flora of Java
1b – 2b – 3b – 4b – 12b – 13b – 14b – 17b – 18b – 19b – 20b – 21b – 22b – 23a – 24b – 25b
– 26b – 27a – 799b – 800b – 801b – 802a – 803b – 804b – 805b. familia 215. Araceae 1b –
2b – 3b – 5b – 8a – 9a – 10a – 11a – 12a – 13b. 19. *Alocasia*. 1a – 2a – 3b. *Alocasia*
macrorrhiza (L.) G. Don. Sinonim: *A. alba* Schott, *A. bantamensis* Kds, *A. crassifolia* Engl.
Deskripsi :
Habitus : Terna.
Batang : Bulat, tidak berkayu, pendek, putih kecoklatan.
Daun : Tunggal, daun lengkap, terdiri dari pelepah, tangkai dan lamina. Pelepah
berwarna hijau, panjang 35 – 46 cm dan tangkai warna hijau, panjang 29
– 32 cm. Lamina bangun jantung, pertulangan daun banyak, tulang
cabang lateral 7 – 10, ujung meruncing, tepi rata, permukaan atas hijau
tua, permukaan bawah hijau muda, herbaceus.
Bunga : Bertongkol, berbentuk silindris, muncul pada ketiak daun.
Buah : Buni, hijau.
Akar : Serabut, berumbi.
Pustaka : Backer c.A. & Brink R.C.B. (1965): *Flora of Java* (Spermatophytes only).
N.V.P. Noordhoff – Groningen – The Netherlands

Surakarta, 08 November 2016
Ttn determinasi

Dra Kartinah Wirjosoendjojo, SU.

Jl. Let.jen Sutoyo, Mojosongo-Solo 57127 Telp.0271-852518, Fax.0271-853275
Homepage : www.setiabudi.ac.id, e-mail : info@setiabudi.ac.id

Lampiran 2. Foto daun dan serbuk daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don).



Daun sente



Serbuk sente

Lampiran 3. Foto alat oven, *Sterling Bidwell* ,maserasi , evaporator, ekstrak kental, autovortex, Mc. Farland 0,5, dan tes bebas etanol ekstrak.



Sterling Bidwell



Evaporator



Ekstrak kental



Maserasi



Oven



Tes Bebas etanol ekstrak



Autoclave



Autovortex



Mc. Farland 0,5

Lampiran 4. Foto fraksinasi, hasil fraksinasi dan larutan stock.



Fraksinasi



Fraksi N-heksana & etil asetat






































Fraksi air



Larutan stock konsentrasi 40%, 10% & 5%

Lampiran 5. Foto identifikasi senyawa serbuk, ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun sente.

Senyawa	Inter pretasi hasil				
	Serbuk	Ekstrak	N-heksana	Etil asetat	air
Alkaloid (Dragendrof)					
Alkaloid (Mayer)					
Flavonoid					
Saponin					

Senyawa	Inter pretasi hasil				
	Serbuk	Ekstrak	N-heksana	Etil asetat	air
Tanin					
Steroid/ sterol					
Sebelum diberi larutan pereaksi					

Lampiran 6. Foto hasil uji difusi.

Foto difusi konsentrasi 40%

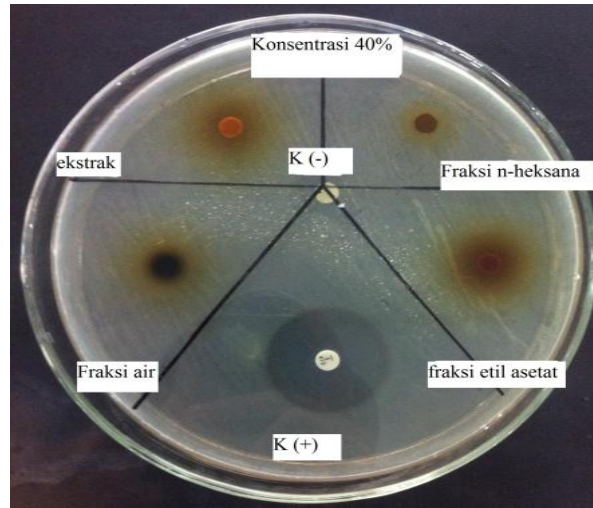
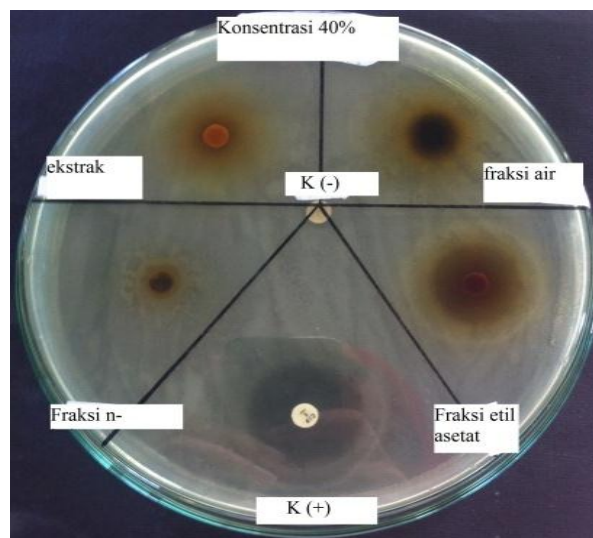
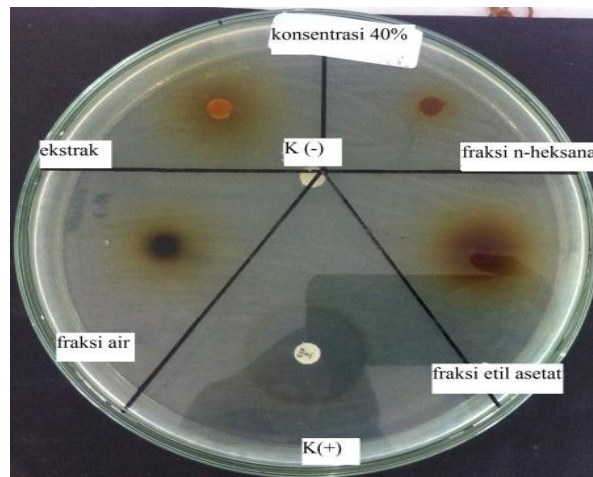
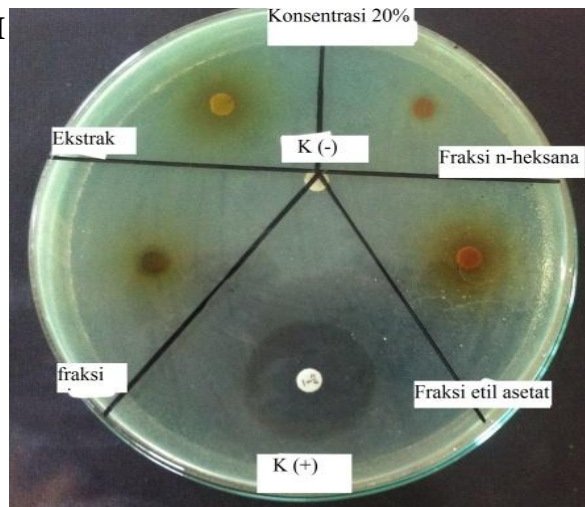
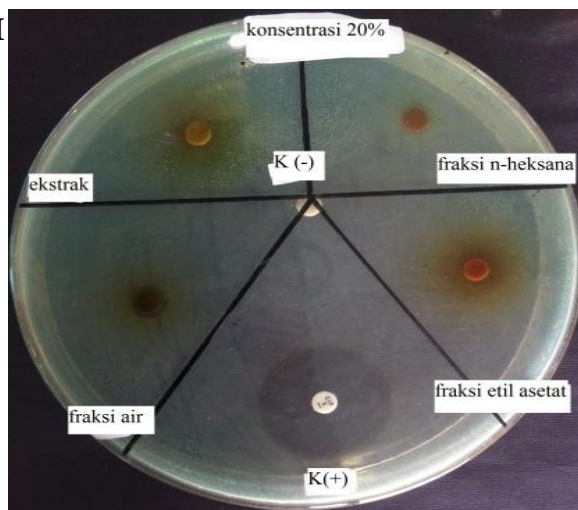
Replikasi I**Replikasi II****Replikasi III**

Foto difusi konsentrasi 20%

Replikasi I



Replikasi II



Replikasi III

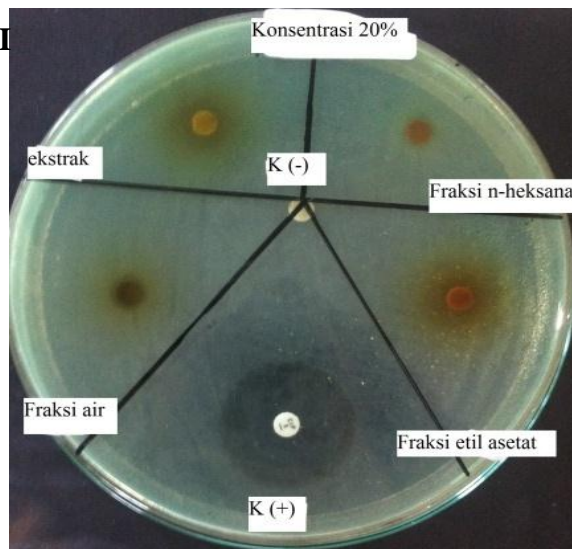
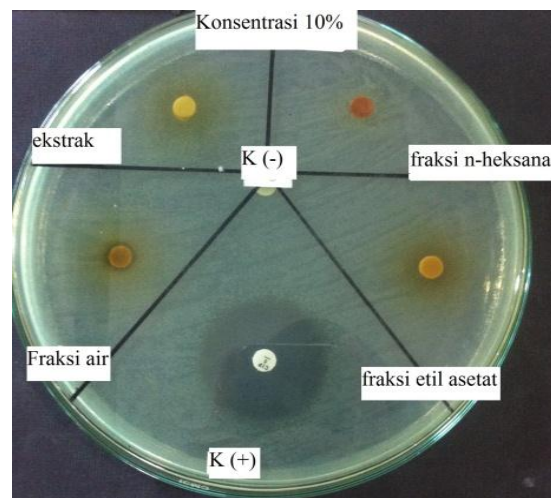
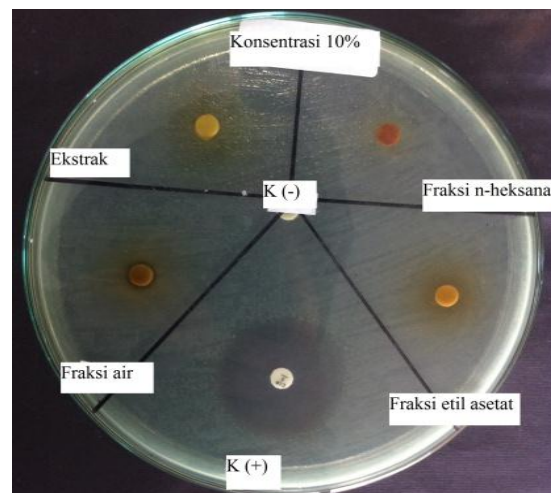


Foto difusi konsentrasi 20%

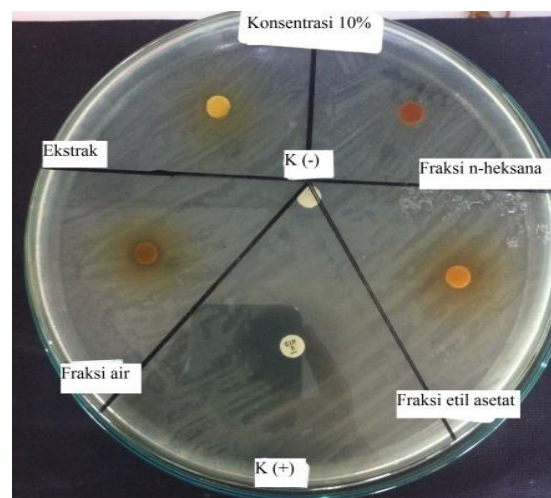
Replikasi I



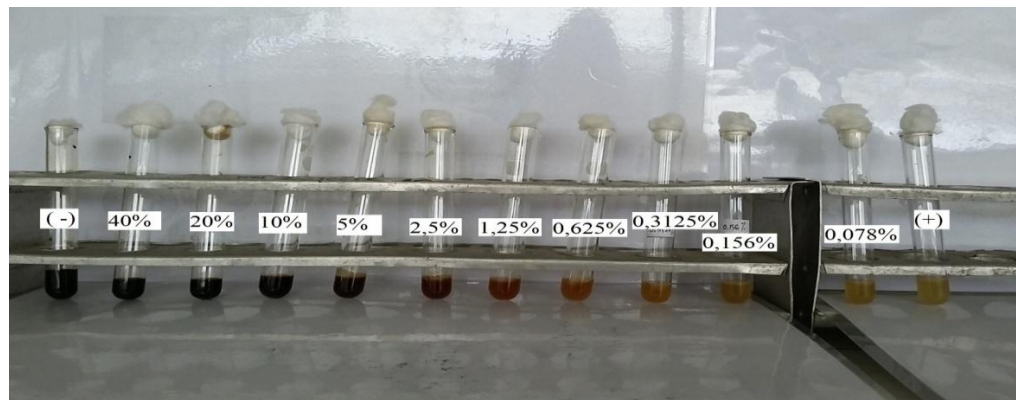
Replikasi II



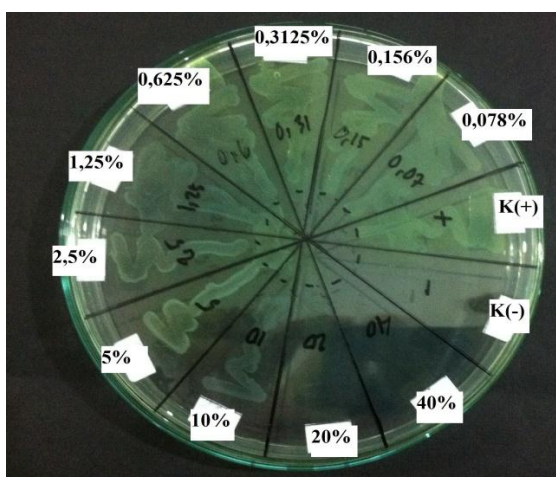
Replikasi III



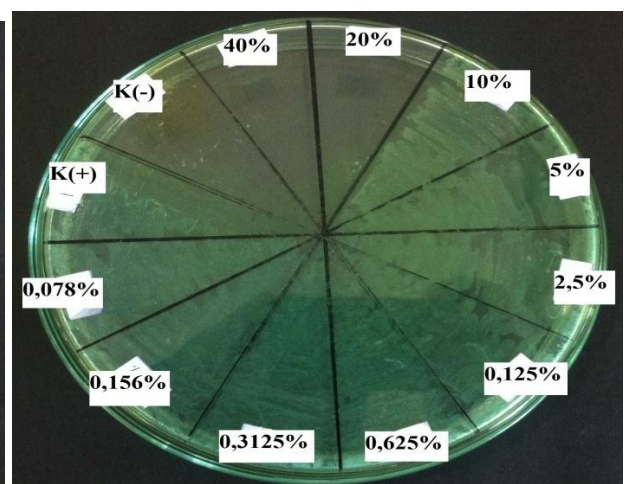
Lampiran 7. Foto hasil uji dilusi



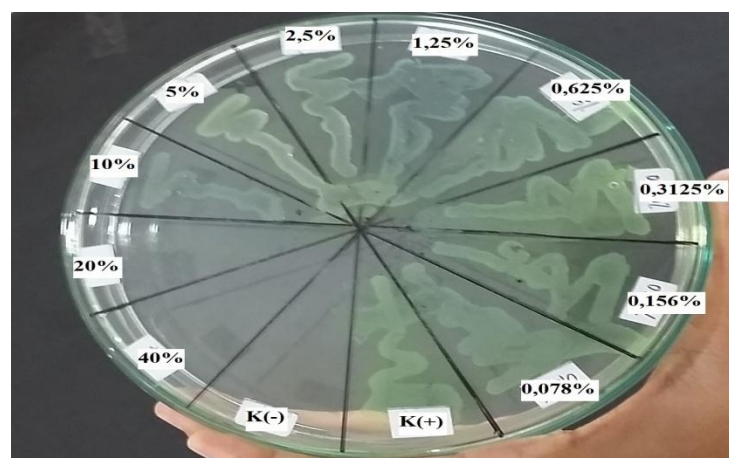
Hasil uji dilusi fraksi teraktif (fraksi etil asetat) daun sente terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3

Lampiran 8. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun sente.

Bobot Basah (Kg)	Bobot kering (Kg)	Persentase%
12	2,2	18,33

$$\text{Presentase (\%)} = \frac{\text{Bobot kering (G)}}{\text{Bobot basah (G)}} \times 100\%$$

$$= \frac{2,2}{12} \times 100\%$$

$$= 18,33\%$$

Lampiran 9. Perhitungan penetapan kadar air pada serbuk sente menggunakan alat *Sterling bidwell*.

Replikasi	Bobot serbuk (g)	Volume air (mL)	Persentase (%)
1	20	1,3	6,5
2	20	1,4	7
3	20	1,3	7
Rata - rata			6,83

$$\text{Penetapan kadar air (Serbuk 1)(\%)} = \frac{\text{Volume air (mL)}}{\text{Bobot serbuk (G)}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,3}{20} \times 100\%$$

$$= 6,5 \%$$

$$\text{Penetapan kadar air (Serbuk 2)(\%)} = \frac{\text{Volume air (mL)}}{\text{Bobot serbuk (G)}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,4}{20} \times 100\%$$

$$= 7 \%$$

$$\text{Penetapan kadar air (Serbuk 3)(\%)} = \frac{\text{Volume air (mL)}}{\text{Bobot serbuk (G)}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,4}{20} \times 100\%$$

$$= 7 \%$$

Lampiran 10. Perhitungan persen rendemen ekstrak etanol

Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen(%)
1.400	271,6	19,40

$$\text{Persen rendemen ekstrak etanol} = \frac{\text{Berat ekstak (G)}}{\text{Berat serbuk (G)}} \times 100\%$$

$$= \frac{271,6}{1400} \times 100\%$$

$$= 19,40\%$$

Lampiran 11. Perhitungan kadar air pada ekstrak etanolik daun sente menggunakan *Sterling Bidwell*.

Replikasi	Bobot serbuk (g)	Volume air (mL)	Persentase (%)
1	20	1,8	9
2	20	1,9	9,5
3	20	1,8	9
Rata - rata			9,2

$$\text{Penetapan kadar air (Replikasi 1)(\%)} = \frac{\text{Volume air (mL)}}{\text{Bobot serbuk (G)}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,8}{20} \times 100\%$$

$$= 9 \%$$

$$\text{Penetapan kadar air (Replikasi 2)(\%)} = \frac{\text{Volume air (mL)}}{\text{Bobot ekstrak (G)}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,9}{20} \times 100\%$$

$$= 9,5 \%$$

$$\text{Penetapan kadar air (Replikasi 1)(\%)} = \frac{\text{Volume air (mL)}}{\text{Bobot ekstrak (G)}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,8}{20} \times 100\%$$

$$= 9 \%$$

Lampiran 12. Perhitungan persen rendemen hasil ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air.

Berat ekstrak (gram)	Berat Fraksi (gram)			Rendemen (%)		
	<i>n</i> - heksana	Etil asetat	air	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	air
10	0,32	0,22	5,57	3,20	2,20	55,70
10	0,51	0,40	7,49	5,10	4,00	74,90
10	0,30	0,28	5,85	3,00	2,80	58,50
10	0,41	0,32	6,42	4,10	3,20	64,20
10	0,40	0,38	6,75	4,00	3,80	67,50
10	0,60	0,57	6,70	6,00	5,70	67,00
10	0,32	0,28	5,80	3,20	2,80	58,00
10	0,30	0,27	6,52	3,00	2,70	65,20
10	0,38	0,38	7,23	3,8	3,80	72,30
10	0,40	0,39	5,75	4,00	3,90	57,50
10	0,30	0,32	7,10	3,00	3,20	71,00
10	0,36	0,35	6,29	3,60	3,50	62,90
10	0,30	0,29	6,80	3,00	2,90	68,00
10	0,30	0,27	6,26	3,00	2,70	62,60
10	0,50	0,48	7,47	5,00	4,70	74,70

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

1. Fraksi *n*-heksana

- % Rendemen fraksi = $\frac{0,32}{10} \times 100\% = 3,20 \%$

2. Fraksi Etil Asetat

- % Rendemen fraksi = $\frac{0,22}{10} \times 100\% = 2,20 \%$

3. Fraksi Air

- % Rendemen fraksi = $\frac{5,57}{10} \times 100\% = 55,70 \%$

Lampiran 13. Pembuatan sediaan untuk uji difusi dan dilusi

A. DMSO 5%

$$\begin{aligned}\text{Rumus} & : V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \\ & V_1 \cdot 100\% = 100 \text{ mL} \cdot 5\% \\ & V_1 = 5 \text{ mL } (^{V/V})\end{aligned}$$

Diambil 5 ml DMSO murni (konsentrasi 5%) ditambahkan aquadest steril sampai 100 ml.

B. Ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun sente (*Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don.) .

$$1. 40\% ^{b/v} = 0,8 \text{ Gram} / 2 \text{ mL}$$

Ditimbang 0,8 gram bahan kemudian dimasukkan dalam vial dan diencerkan dengan DMSO 5% sebanyak 2 mL.

$$2. 20\% ^{b/v}$$

$$\begin{aligned}\text{Rumus} & : V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \\ & V_1 \cdot 40 = 1 \cdot 20 \\ & V_1 = 0,5 \text{ mL}\end{aligned}$$

Dipipet 0,5 ml larutan induk konsentrasi 40% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 1 mL.

$$3. 10\% ^{b/v}$$

$$\begin{aligned}\text{Rumus} & : V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \\ & V_1 \cdot 20 = 1 \cdot 10 \\ & V_1 = 0,5 \text{ mL}\end{aligned}$$

Dipipet 0,5 ml larutan induk konsentrasi 20% dimasukkan dalam vial yang sudah dikalibrasi dan diencerkan dengan DMSO 5% ad 1 mL.

C. Perhitungan dan pembuatan larutan stok ekstrak etanolik dan fraksi daun sente.

$$\text{Larutan stok } 40\% = \% ^{b/v} = 40 \text{ Gram} / 100 \text{ mL}$$

$$\text{Konsentrasi } 40\% = 0,4 \text{ Gram/mL}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi } 20\% & = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \\ 0,5 \cdot 40\% & = 1 \cdot C_2 \\ C_2 & = 20\%\end{aligned}$$

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

$$0,5 \cdot 20\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 10\%$$

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

$$0,5 \cdot 10\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 5\%$$

$$\text{Konsentrasi } 2,5\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

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

$$C_2 = 2,5\%$$

$$\text{Konsentrasi } 1,25\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

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

$$C_2 = 1,25\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,625\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 1,25\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,625\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,312\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,625\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,312\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,156\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,312\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,156\%$$

$$\text{Konsentrasi } 0,078\% = V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$0,5 \cdot 0,156\% = 1 \cdot C_2$$

$$C_2 = 0,078\%$$

Kontrol negatif (-) : 1 mL ekstrak etanolik, dan fraksi teraktif

Kontrol positif (+) : 1 mL suspensi bakteri.

Lampiran 14. Perhitungan diameter hambat pada uji antibakteri pada daun sente terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara difusi.

Sediaan uji	Konsentrasi	Diameter daya hambat (mm)			Rata – rata (mm)
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	40%	8	9	10	9,00
	20%	12	10	13	11,67
	10%	9	7	8	8,00
Fraksi <i>n</i> -heksana	40%	0	0	0	0,00
	20%	0	0	0	0,00
	10%	0	0	0	0,00
Fraksi etil asetat	40%	14	16	15	15,00
	20%	10	11	12	11,00
	10%	10	9	11	10,00
Fraksi air	40%	11	12	11	11,33
	20%	8	7	10	8,33
	10%	8	7	9	8,00
Kontrol negatif	5%	0	0	0	0,00
Kontrol positif	5µg	28,33	29	27	28,11

Konsentrasi 40%

$$\text{Rata – rata daerah hambat ekstrak etanol} = \frac{8+9+10}{3} = 9,00 \text{ mm}$$

$$\text{Rata – rata daerah hambat fraksi } n\text{-heksana} = \frac{0+0+0}{3} = 0 \text{ mm}$$

$$\text{Rata – rata daerah hambat fraksi etil asetat} = \frac{14+16+15}{3} = 15,00 \text{ mm}$$

$$\text{Rata – rata daerah hambat fraksi air} = \frac{11+12+11}{3} = 11,33 \text{ mm}$$

Konsentrasi 20%

$$\text{Rata – rata daerah hambat ekstrak etanol} = \frac{12+10+13}{3} = 11,67 \text{ mm}$$

$$\text{Rata – rata daerah hambat fraksi } n\text{-heksana} = \frac{0+0+0}{3} = 0,00 \text{ mm}$$

$$\text{Rata – rata daerah hambat fraksi etil asetat} = \frac{10+11+12}{3} = 11,00 \text{ mm}$$

$$\text{Rata – rata daerah hambat fraksi air} = \frac{8+7+10}{3} = 8,33 \text{ mm}$$

Konsentrasi 10%

$$\text{Rata – rata daerah hambat ekstrak etanol} = \frac{9+7+8}{3} = 8,00 \text{ mm}$$

$$\text{Rata – rata daerah hambat fraksi } n\text{-heksana} = \frac{0+0+0}{3} = 0,00 \text{ mm}$$

$$\text{Rata – rata daerah hambat fraksi etil asetat} = \frac{10+9+11}{3} = 10,00 \text{ mm}$$

$$\text{Rata – rata daerah hambat fraksi air} = \frac{8+7+9}{3} = 8,00 \text{ mm}$$

DMSO 5%

$$\text{Rata – rata daerah hambat DMSO 5\%} = \frac{0+0+0}{3} = 0,00 \text{ mm}$$

Siprofloksasin 5 μ g

$$\text{Rata – rata daerah hambat Ciprofloksasin 5}\mu\text{g} = \frac{28,33+29+27}{3} = 28,11 \text{ mm}$$

Lampiran 15. Standar kekeruhan Mc Farland 0,5%

Standar	Volume dalam ml		Number of bacteria/mL/(10 ⁸) represented
	1% BaCl ₂	1% H ₂ SO ₄	
0,5	0,5	99,5	1,5
1	1,0	99,0	3
2	2,0	98,0	6
3	3,0	97,0	9
4	4,0	96,0	12
5	5,0	95,0	15
6	6,0	94,0	18
7	7,0	93,0	21
8	8,0	92,0	24
9	9,0	91,0	27
10	10,0	90,0	30

Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media.

1. Formulasi dan pembuatan Brain Heart Infusion (BHI)

Brain infusion	12,5 gram
Heart infusion	5,0 gram
Protease pepton	10,0 gram
Glucose	2,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
Di-sodium hydrogen phosphate	2,5 gram
Aquadest ad	1000 mL

Reagen – reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autokla pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

2. Formulasi dan pembuatan *Pseudomonas Selectif Agar* (PSA)

Pepton rom Casein	10,0 gram
Pepton farm Meat	3,5 gram
Laktosa	10,0 gram
Sodium sulfit	2,5 gram
Fuchsin	0,4 gram
Agar – agar	12,5 gram
pH	7,4

Reagen – reagen diatas dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1 L, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan daalm cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

3. Formulasi dan pembuatan *Muller Hinton Agar* (MHA)

Beef, dehydrate infusion from	300,0 gram
Casein hydrolase	17,5 gram
Starch	1,5 gram
Agar – agar	17,0 gram
Aquadestilata ad	1000 mL

Semua bahan dilarutkan dalam aquadestilata sampai 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.

4. Formulasi dan pembuatan Sulfida Indol Motility (SIM)

Pepton from casein	20 gram
Pepton from meat	6 gram
Ammonium Iron (II) citrate	0,2 gram
Sodium thiosulfate	0,2 gram
Agar – Agar	0,2 gram
Aquadest ad	1000 ml, pH 7,4

Bahan – bahan dilarutkan ke dalam aquadest 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH7,4 (Bridson 1998).

5. Formulasi dan pembuatan Klinger Iron Agar (KIA)

Pepton from casein	15 gram
Pepton from meat	5 gram
Ammonium Iron (II) citrate	0,5 gram
Meat extract	3 gram
Yeast extract	3 gram
Sodium chloride	5 gram
Laktosa	10 gram
Glukosa	1 gram
Sodium thiosulfate	0,5 gram
Phenol red	0,024 gram
Agar – agar	12 gram
Aquadest ad	1000 ml, pH 7,4

Bahan – bahan dilarutkan ke dalam aquadest 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

6. Formulasi dan pembuatan Lysine Iron Agar (LIA)

Pepton from casein	5 gram
--------------------	--------

Yeast extract	3 gram
Glukosa	1 gram
Lysine monohydrochloride	10 gram
Sodium thiosulfate	0,04 gram
Ammonium Iron (II) citrate	0,5 gram
Bromo cresol purple	0,02 gram
Agar – agar	12,5 gram
Aquadest ad	1000 mL, pH 7,4

Bahan – bahan di atas dilarutkan ke dalam aquadest 1000 mL, dipanaskan sampai sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

7. Formulasi dan pembuatan Citrat Agar

Ammonium hydrogen fosfat	1 gram
Di-postassium hydrogen fosfate	1 gram
Sodium chloride	5 gram
Magnesium sulfate	0,2 gram
Bromo thymol blue	0,08 gram
Agar – agar	12,5 gram
Aquadest ad	1000 mL, pH 7,4

Bahan – bahan dilarutkan ke dalam aquadest 1000 mL, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

Lampiran 17. Analisis ANOVA.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Daya Hambat	42	8,6033	7,41361	,00	29,00

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Daya Hambat
N		42
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	8,6033
	Std. Deviation	7,41361
	Absolute	,163
Most Extreme Differences	Positive	,163
	Negative	-,129
Kolmogorov-Smirnov Z		1,055
Asymp. Sig. (2-tailed)		,216

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Kesimpulan : Dari data diatas diperoleh nilai signifikansi = $0,216 > 0,05$ (H_0 diterima) sehingga data tersebut terdistribusi secara normal.

Test of Homogeneity of Variances

Daya Hambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,975	13	28	,064

Kesimpulan : Nilai probabilitisa *Levene Statistic* adalah $0,064 > 0,05$ maka H_0 diterima, atau sediaan uji mempunyai varians yang yang sama

ANOVA

Daya Hambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2229,350	13	171,488	199,429	,000
Within Groups	24,077	28	,860		
Total	2253,427	41			

Kesimpulan : Dari analisis data ANOVA diperoleh nilai signifikansi = $0,000 < 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang nyata pada sediaan uji tersebut terhadap daya hambat aktivitas antibakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Daya Hambat

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Ekstrak 40%	Ekstrak 20%	-2,66667	,75714	,068	-5,4381	,1048
	Ekstrak 10%	1,00000	,75714	,984	-1,7714	3,7714
	fraksi n-heksana 40%	9,00000	,75714	,000	6,2286	11,7714
	fraksi n-heksana 20%	9,00000	,75714	,000	6,2286	11,7714
	fraksi n-heksana 10%	9,00000	,75714	,000	6,2286	11,7714
	fraksi etil asetat 40%	-6,00000	,75714	,000	-8,7714	-3,2286
	fraksi etil asetat 20%	-2,00000	,75714	,360	-4,7714	,7714
	fraksi etil asetat 10%	-1,00000	,75714	,984	-3,7714	1,7714
	fraksi air 40%	-2,33333	,75714	,169	-5,1048	,4381
	fraksi air 20%	,66667	,75714	1,000	-2,1048	3,4381
	fraksi air 10%	1,00000	,75714	,984	-1,7714	3,7714
	Siprofloksasin	-19,11333	,75714	,000	-21,8848	-16,3419
	DMSO 5%	9,00000	,75714	,000	6,2286	11,7714
Ekstrak 20%	Ekstrak 40%	2,66667	,75714	,068	-,1048	5,4381
	Ekstrak 10%	3,66667	,75714	,003	,8952	6,4381
	fraksi n-heksana 40%	11,66667	,75714	,000	8,8952	14,4381
	fraksi n-heksana 20%	11,66667	,75714	,000	8,8952	14,4381
	fraksi n-heksana 10%	11,66667	,75714	,000	8,8952	14,4381
	fraksi etil asetat 40%	-3,33333	,75714	,008	-6,1048	-,5619
	fraksi etil asetat 20%	,66667	,75714	1,000	-2,1048	3,4381
	fraksi etil asetat 10%	1,66667	,75714	,631	-1,1048	4,4381
	fraksi air 40%	,33333	,75714	1,000	-2,4381	3,1048
	fraksi air 20%	3,33333	,75714	,008	,5619	6,1048
	fraksi air 10%	3,66667	,75714	,003	,8952	6,4381
	Siprofloksasin	-16,44667	,75714	,000	-19,2181	-13,6752
	DMSO 5%	11,66667	,75714	,000	8,8952	14,4381
Ekstrak 10%	Ekstrak 40%	-1,00000	,75714	,984	-3,7714	1,7714
	Ekstrak 20%	-3,66667	,75714	,003	-6,4381	-,8952
	fraksi n-heksana 40%	8,00000	,75714	,000	5,2286	10,7714
	fraksi n-heksana 20%	8,00000	,75714	,000	5,2286	10,7714
	fraksi n-heksana 10%	8,00000	,75714	,000	5,2286	10,7714
	fraksi etil asetat 40%	-7,00000	,75714	,000	-9,7714	-4,2286
	fraksi etil asetat 20%	-3,00000	,75714	,025	-5,7714	-,2286
	fraksi etil asetat 10%	-2,00000	,75714	,360	-4,7714	,7714
	fraksi air 40%	-3,33333	,75714	,008	-6,1048	-,5619
	fraksi air 20%	-,33333	,75714	1,000	-3,1048	2,4381
	fraksi air 10%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
	Siprofloksasin	-20,11333	,75714	,000	-22,8848	-17,3419
	DMSO 5%	8,00000	,75714	,000	5,2286	10,7714

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
fraksi n- heksana 40%	Ekstrak 40%	-9,00000	,75714	,000	-11,7714	-6,2286
	Ekstrak 20%	-11,66667	,75714	,000	-14,4381	-8,8952
	Ekstrak 10%	-8,00000	,75714	,000	-10,7714	-5,2286
	fraksi n-heksana 20%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
	fraksi n-heksana 10%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
	fraksi etil asetat 40%	-15,00000	,75714	,000	-17,7714	-12,2286
	fraksi etil asetat 20%	-11,00000	,75714	,000	-13,7714	-8,2286
	fraksi etil asetat 10%	-10,00000	,75714	,000	-12,7714	-7,2286
	fraksi air 40%	-11,33333	,75714	,000	-14,1048	-8,5619
	fraksi air 20%	-8,33333	,75714	,000	-11,1048	-5,5619
	fraksi air 10%	-8,00000	,75714	,000	-10,7714	-5,2286
	Siprofloksasin	-28,11333	,75714	,000	-30,8848	-25,3419
	DMSO 5%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
fraksi n- heksana 20%	Ekstrak 40%	-9,00000	,75714	,000	-11,7714	-6,2286
	Ekstrak 20%	-11,66667	,75714	,000	-14,4381	-8,8952
	Ekstrak 10%	-8,00000	,75714	,000	-10,7714	-5,2286
	fraksi n-heksana 40%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
	fraksi n-heksana 10%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
	fraksi etil asetat 40%	-15,00000	,75714	,000	-17,7714	-12,2286
	fraksi etil asetat 20%	-11,00000	,75714	,000	-13,7714	-8,2286
	fraksi etil asetat 10%	-10,00000	,75714	,000	-12,7714	-7,2286
	fraksi air 40%	-11,33333	,75714	,000	-14,1048	-8,5619
	fraksi air 20%	-8,33333	,75714	,000	-11,1048	-5,5619
	fraksi air 10%	-8,00000	,75714	,000	-10,7714	-5,2286
	Siprofloksasin	-28,11333	,75714	,000	-30,8848	-25,3419
	DMSO 5%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
fraksi n- heksana 10%	Ekstrak 40%	-9,00000	,75714	,000	-11,7714	-6,2286
	Ekstrak 20%	-11,66667	,75714	,000	-14,4381	-8,8952
	Ekstrak 10%	-8,00000	,75714	,000	-10,7714	-5,2286
	fraksi n-heksana 40%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
	fraksi n-heksana 20%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
	fraksi etil asetat 40%	-15,00000	,75714	,000	-17,7714	-12,2286
	fraksi etil asetat 20%	-11,00000	,75714	,000	-13,7714	-8,2286
	fraksi etil asetat 10%	-10,00000	,75714	,000	-12,7714	-7,2286
	fraksi air 40%	-11,33333	,75714	,000	-14,1048	-8,5619
	fraksi air 20%	-8,33333	,75714	,000	-11,1048	-5,5619
	fraksi air 10%	-8,00000	,75714	,000	-10,7714	-5,2286
	Siprofloksasin	-28,11333	,75714	,000	-30,8848	-25,3419
	DMSO 5%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
fraksi etil asetat 40%	Ekstrak 40%	6,00000	,75714	,000	3,2286	8,7714
	Ekstrak 20%	3,33333	,75714	,008	,5619	6,1048
	Ekstrak 10%	7,00000	,75714	,000	4,2286	9,7714
	fraksi n-heksana 40%	15,00000	,75714	,000	12,2286	17,7714
	fraksi n-heksana 20%	15,00000	,75714	,000	12,2286	17,7714
	fraksi n-heksana 10%	15,00000	,75714	,000	12,2286	17,7714
	fraksi etil asetat 20%	4,00000	,75714	,001	1,2286	6,7714
	fraksi etil asetat 10%	5,00000	,75714	,000	2,2286	7,7714
	fraksi air 40%	3,66667	,75714	,003	,8952	6,4381
	fraksi air 20%	6,66667	,75714	,000	3,8952	9,4381
	fraksi air 10%	7,00000	,75714	,000	4,2286	9,7714
	Siprofloksasin	-13,11333	,75714	,000	-15,8848	-10,3419
	DMSO 5%	15,00000	,75714	,000	12,2286	17,7714

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
fraksi etil asetat 20%	Ekstrak 40%	2,00000	,75714	,360	-,7714	4,7714
	Ekstrak 20%	-,66667	,75714	1,000	-3,4381	2,1048
	Ekstrak 10%	3,00000	,75714	,025	,2286	5,7714
	fraksi n-heksana 40%	11,00000	,75714	,000	8,2286	13,7714
	fraksi n-heksana 20%	11,00000	,75714	,000	8,2286	13,7714
	fraksi n-heksana 10%	11,00000	,75714	,000	8,2286	13,7714
	fraksi etil asetat 40%	-4,00000	,75714	,001	-6,7714	-1,2286
	fraksi etil asetat 10%	1,00000	,75714	,984	-1,7714	3,7714
	fraksi air 40%	-,33333	,75714	1,000	-3,1048	2,4381
	fraksi air 20%	2,66667	,75714	,068	-,1048	5,4381
	fraksi air 10%	3,00000	,75714	,025	,2286	5,7714
	Siprofloksasin	-17,11333	,75714	,000	-19,8848	-14,3419
	DMSO 5%	11,00000	,75714	,000	8,2286	13,7714
fraksi etil asetat 10%	Ekstrak 40%	1,00000	,75714	,984	-1,7714	3,7714
	Ekstrak 20%	-1,66667	,75714	,631	-4,4381	1,1048
	Ekstrak 10%	2,00000	,75714	,360	-,7714	4,7714
	fraksi n-heksana 40%	10,00000	,75714	,000	7,2286	12,7714
	fraksi n-heksana 20%	10,00000	,75714	,000	7,2286	12,7714
	fraksi n-heksana 10%	10,00000	,75714	,000	7,2286	12,7714
	fraksi etil asetat 40%	-5,00000	,75714	,000	-7,7714	-2,2286
	fraksi etil asetat 20%	-1,00000	,75714	,984	-3,7714	1,7714
	fraksi air 40%	-1,33333	,75714	,875	-4,1048	1,4381
	fraksi air 20%	1,66667	,75714	,631	-1,1048	4,4381
	fraksi air 10%	2,00000	,75714	,360	-,7714	4,7714
	Siprofloksasin	-18,11333	,75714	,000	-20,8848	-15,3419
	DMSO 5%	10,00000	,75714	,000	7,2286	12,7714
fraksi air 40%	Ekstrak 40%	2,33333	,75714	,169	-,4381	5,1048
	Ekstrak 20%	-,33333	,75714	1,000	-3,1048	2,4381
	Ekstrak 10%	3,33333	,75714	,008	,5619	6,1048
	fraksi n-heksana 40%	11,33333	,75714	,000	8,5619	14,1048
	fraksi n-heksana 20%	11,33333	,75714	,000	8,5619	14,1048
	fraksi n-heksana 10%	11,33333	,75714	,000	8,5619	14,1048
	fraksi etil asetat 40%	-3,66667	,75714	,003	-6,4381	-,8952
	fraksi etil asetat 20%	,33333	,75714	1,000	-2,4381	3,1048
	fraksi etil asetat 10%	1,33333	,75714	,875	-1,4381	4,1048
	fraksi air 20%	3,00000	,75714	,025	,2286	5,7714
	fraksi air 10%	3,33333	,75714	,008	,5619	6,1048
	Siprofloksasin	-16,78000	,75714	,000	-19,5514	-14,0086
	DMSO 5%	11,33333	,75714	,000	8,5619	14,1048
fraksi air 20%	Ekstrak 40%	-,66667	,75714	1,000	-3,4381	2,1048
	Ekstrak 20%	-3,33333	,75714	,008	-6,1048	-,5619
	Ekstrak 10%	,33333	,75714	1,000	-2,4381	3,1048
	fraksi n-heksana 40%	8,33333	,75714	,000	5,5619	11,1048
	fraksi n-heksana 20%	8,33333	,75714	,000	5,5619	11,1048
	fraksi n-heksana 10%	8,33333	,75714	,000	5,5619	11,1048
	fraksi etil asetat 40%	-6,66667	,75714	,000	-9,4381	-3,8952
	fraksi etil asetat 20%	-2,66667	,75714	,068	-5,4381	1,1048
	fraksi etil asetat 10%	-1,66667	,75714	,631	-4,4381	1,1048
	fraksi air 40%	-3,00000	,75714	,025	-5,7714	-,2286
	fraksi air 10%	,33333	,75714	1,000	-2,4381	3,1048
	Siprofloksasin	-19,78000	,75714	,000	-22,5514	-17,0086
	DMSO 5%	8,33333	,75714	,000	5,5619	11,1048

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
fraksi air 10%	Ekstrak 40%	-1,00000	,75714	,984	-3,7714	1,7714
	Ekstrak 20%	-3,66667	,75714	,003	-6,4381	-,8952
	Ekstrak 10%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
	fraksi n-heksana 40%	8,00000	,75714	,000	5,2286	10,7714
	fraksi n-heksana 20%	8,00000	,75714	,000	5,2286	10,7714
	fraksi n-heksana 10%	8,00000	,75714	,000	5,2286	10,7714
	fraksi etil asetat 40%	-7,00000	,75714	,000	-9,7714	-4,2286
	fraksi etil asetat 20%	-3,00000	,75714	,025	-5,7714	-,2286
	fraksi etil asetat 10%	-2,00000	,75714	,360	-4,7714	,7714
	fraksi air 40%	-3,33333	,75714	,008	-6,1048	-,5619
	fraksi air 20%	-,33333	,75714	1,000	-3,1048	2,4381
	Siprofloksasin	-20,11333	,75714	,000	-22,8848	-17,3419
	DMSO 5%	8,00000	,75714	,000	5,2286	10,7714
Siprofloksasin	Ekstrak 40%	19,11333	,75714	,000	16,3419	21,8848
	Ekstrak 20%	16,44667	,75714	,000	13,6752	19,2181
	Ekstrak 10%	20,11333	,75714	,000	17,3419	22,8848
	fraksi n-heksana 40%	28,11333	,75714	,000	25,3419	30,8848
	fraksi n-heksana 20%	28,11333	,75714	,000	25,3419	30,8848
	fraksi n-heksana 10%	28,11333	,75714	,000	25,3419	30,8848
	fraksi etil asetat 40%	13,11333	,75714	,000	10,3419	15,8848
	fraksi etil asetat 20%	17,11333	,75714	,000	14,3419	19,8848
	fraksi etil asetat 10%	18,11333	,75714	,000	15,3419	20,8848
	fraksi air 40%	16,78000	,75714	,000	14,0086	19,5514
	fraksi air 20%	19,78000	,75714	,000	17,0086	22,5514
	fraksi air 10%	20,11333	,75714	,000	17,3419	22,8848
	DMSO 5%	28,11333	,75714	,000	25,3419	30,8848
DMSO 5%	Ekstrak 40%	-9,00000	,75714	,000	-11,7714	-6,2286
	Ekstrak 20%	-11,66667	,75714	,000	-14,4381	-8,8952
	Ekstrak 10%	-8,00000	,75714	,000	-10,7714	-5,2286
	fraksi n-heksana 40%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
	fraksi n-heksana 20%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
	fraksi n-heksana 10%	,00000	,75714	1,000	-2,7714	2,7714
	fraksi etil asetat 40%	-15,00000	,75714	,000	-17,7714	-12,2286
	fraksi etil asetat 20%	-11,00000	,75714	,000	-13,7714	-8,2286
	fraksi etil asetat 10%	-10,00000	,75714	,000	-12,7714	-7,2286
	fraksi air 40%	-11,33333	,75714	,000	-14,1048	-8,5619
	fraksi air 20%	-8,33333	,75714	,000	-11,1048	-5,5619
	fraksi air 10%	-8,00000	,75714	,000	-10,7714	-5,2286
	Siprofloksasin	-28,11333	,75714	,000	-30,8848	-25,3419

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

Daya Hambat

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
fraksi n-heksana 40%	3	,0000					
fraksi n-heksana 20%	3	,0000					
fraksi n-heksana 10%	3	,0000					
DMSO 5%	3	,0000					
Ekstrak 10%	3		8,0000				
fraksi air 10%	3		8,0000				
fraksi air 20%	3		8,3333	8,3333			
Ekstrak 40%	3		9,0000	9,0000	9,0000		
fraksi etil asetat 10%	3		10,0000	10,0000	10,0000		
fraksi etil asetat 20%	3			11,0000	11,0000		
fraksi air 40%	3				11,3333		
Ekstrak 20%	3				11,6667		
fraksi etil asetat 40%	3					15,0000	
Siprofloksasin	3						28,1133
Sig.		1,000	,360	,068	,068	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

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

Lampiran 18. Daftar Singkatan.

ATCC	: American Type Culture Collection
KBM	: Konsentrasi Bunuh Minimum
KHM	: Konsentrasi Hambat Minimum
PSA	: Pseudomonas Selective Agar
BHI	: Brain Heart Infusion
CFU	: Colony Forming Unit
DMSO	: Dimethyl sulfoxide