



**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI  
EKSTRAK ETANOL DAUN WARU GUNUNG (*Hibiscus  
macrophyllus* Roxb. ex Hornem) TERHADAP  
*Bacillus cereus***

**SKRIPSI**

Oleh:

**Riza Putri Agustina**

**NIM 132210101033**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2017**



**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI  
EKSTRAK ETANOL DAUN WARU GUNUNG (*Hibiscus  
macrophyllus* Roxb. ex Hornem) TERHADAP  
*Bacillus cereus***

**SKRIPSI**

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
Untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi (S1)  
Dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

**Riza Putri Agustina**

**NIM 132210101033**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2017**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya kepada hamba-Nya yang selalu berjuang dalam kebaikan;
2. Ibunda Nur Aidah dan Ayahanda Zahroni tercinta, terima kasih atas dorongan moril, materil, doa dan kasih sayang yang senantiasa mengiringi setiap langkah penulis;
3. Kakak-adik dan seluruh keluarga besar penulis di Gresik, terima kasih atas dukungan dan motivasi yang selalu mengiringi mencapai jenjang pendidikan yang lebih tinggi;
4. Guru-guru penulis sejak Taman Kanak-kanak (TK) hingga Sekolah Menengah Atas (SMA), dosen, laboran dan segenap civitas akademika yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan saya manusia yang berilmu dan bertakwa.
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember;

## MOTO

“Filterlah apa yang akan kita ucap, tulis dan lakukan. Semoga masa depan kita diperbaiki oleh Allah seiring dengan usaha kita memperbaiki ucapan, tulisan, serta tindakan kita”<sup>\*)</sup>

“Tugas hidup manusia yaitu beriman, berilmu dan beramal”-Yakusa

“Rumpun bambu terkuat tumbuh di atas tanah yang keras”

(MPA Pring Kuning)

---

<sup>\*)</sup> Rifan, Ahmad Rifa'i. 2014. *God I Miss You: 101 Cara Mengobati Luka Jiwa Bersama Tuhan*. Jakarta: PT Elex Media Komputindo.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

nama : Riza Putri Agustina

NIM : 132210101033

menyatakan dengan ini sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Skринing Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Waru Gunung (*Hibiscus macrophyllus* Roxb. ex Hornem) terhadap *Bacillus cereus*” adalah hasil karya sendiri, kecuali pengutipan substansi yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 10 Juli 2017

Yang menyatakan,

(Riza Putri Agustina)  
NIM 132210101033

**SKRIPSI**

**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI  
EKSTRAK ETANOL DAUN WARU GUNUNG (*Hibiscus  
macrophyllus* Roxb. ex Hornem) TERHADAP  
*Bacillus cereus***

Oleh:

Riza Putri Agustina

NIM 132210101033

**Pembimbing**

Dosen Pembimbing Utama : Indah Purnama Sary, S. Si., M.Farm., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm. Apt.

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2017**

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Waru Gunung (*Hibiscus macrophyllus* Roxb. ex Hornem) terhadap *Bacillus cereus*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 26 Juli 2017

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Penguji

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

Indah Purnama S., S. Si., M. Farm., Apt. Dewi Dianasari, S. Farm., M. Farm., Apt.  
NIP 198304282008122004 NIP 198712082014042002

Penguji I,

Penguji II,

Indah Yulia N., S. Farm., M. Farm., Apt. Dian Agung P., S. Farm., M. Farm., Apt.  
NIP 198407122008122002 NIP 198410082008121004

Mengesahkan

Dekan,

Lestyo Wulandari, S. Si., M. Farm., Apt.  
NIP 197604142002122001

## RINGKASAN

**Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Waru Gunung (*Hibiscus macrophyllus* Roxb. ex Hornem) terhadap *Bacillus cereus*;** Riza Putri Agustina, 132210101033; 2017; 82 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Infeksi merupakan salah satu penyebab utama masalah kesehatan di dunia, terutama di negara berkembang dan tropis, seperti Indonesia. Infeksi dengan dua proporsi tertinggi yang masih mengalami peningkatan dari tahun 2007-2015 adalah diare dan pneumonia. Sebagian besar penyakit infeksi diare dan pneumonia disebabkan oleh bakteri. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi diare (gastroenteritis) dan pneumonia (infeksi saluran pernafasan) adalah *Bacillus cereus*. Dalam mengatasi infeksi bakteri *B. cereus* diperlukan adanya senyawa antibakteri.

Antibakteri yang digunakan oleh penderita infeksi umumnya berupa obat-obatan sintetik. Penggunaan obat sintetik dalam jangka panjang sering kali menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan. Selain itu, penggunaan antibakteri yang tidak tepat dapat menimbulkan resistensi. Sehingga diperlukan alternatif antibakteri lain seperti penggunaan senyawa aktif atau golongan senyawa yang berasal dari tumbuhan. Salah satu genus yang digunakan sebagai agen antibakteri adalah genus *Hibiscus*. *Hibiscus* yang banyak tersebar di Indonesia adalah *Hibiscus macrophyllus*. Namun, belum ditemukan data penelitian mengenai aktivitas antibakteri *H. macrophyllus*.

Dalam penelitian ini dilakukan skrining fitokimia dan pembuktian secara ilmiah adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* terhadap *B. cereus*. Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa ekstrak etanol daun *H. macrophyllus*. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* menggunakan metode difusi sumuran dan mikrodilusi dengan gentamisin sebagai kontrol positif. Metode difusi sumuran



bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar sumuran. Sedangkan metode mikrodilusi bertujuan untuk mengetahui nilai  $KH_{50}$  aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun *H. macrophyllus*.

Hasil skrining fitokimia golongan senyawa metabolit sekunder menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin, saponin, terpenoid dan steroid. Pada uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi (sumuran) menggunakan empat seri konsentrasi ekstrak yaitu 50, 100, 250, dan 500 mg/mL. Hasil pengamatan uji tersebut dianalisis dengan *One Way ANOVA* dan *LSD* pada taraf kepercayaan 95% yang diperoleh  $p=0,000$ . Hal ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada setiap konsentrasi pengujian. Semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak uji, maka semakin besar zona bening yang dihasilkan. Diameter zona hambat pengujian ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* termasuk memiliki aktivitas antibakteri kategori lemah hingga baik. Diameter zona hambat ekstrak uji terbesar ditunjukkan pada konsentrasi 500,0 mg/mL sebesar  $8,54 \pm 0,44$  mm. Pada metode mikrodilusi dilakukan menggunakan enam seri konsentrasi ekstrak yaitu 500,0; 250,0; 125,0; 62,50; 31,25 dan 15,63  $\mu\text{g/mL}$  yang diukur dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi dianalisis dengan program *probit* untuk memperoleh nilai  $KH_{50}$ . Nilai  $KH_{50}$  ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* terhadap *B. cereus* sebesar 32,64  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* memiliki aktivitas antibakteri yang relevan dan selektif dengan nilai  $KH_{50}$  di bawah 100  $\mu\text{g/mL}$ .

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat ALLAH SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul "Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Waru Gunung (*Hibiscus macrophyllus* Roxb. ex Hornem) terhadap *Bacillus cereus*". Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat untuk dapat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu Lestyo Wulandari, S. Si., Apt., M. Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Lusia Oktora Ruma Kumala Sari, S. Farm., M.Sc., Apt., selaku Dosen Pembimbing Akademik; yang telah memberikan motivasi dan semangat belajar selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Ibu Indah Purnama Sary, S. Farm., M. S.Si., Apt., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Dewi Dianasari, S. Farm., Apt., M. Farm selaku Dosen Pembimbing Anggota; yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam membantu penulisan skripsi ini;
4. Indah Yulia N, S. Farm., M. Farm., Apt. dan Bapak Dian Agung P., S. Farm., M. Farm., Apt selaku Dosen Penguji; yang telah memberikan bantuan, saran, waktu, dan perhatian atas penulisan skripsi ini;
5. Segenap dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan dedikasi selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Pada teknisi labotarorium, Bu Widi, Mbak Parkha, Mbak Dini, Mbak Indri, Bu Hani dan Bu wayan yang telah banyak membantu selama proses penelitian;

7. Ibunda Nur Aidah dan Ayahanda Zahroni tercinta, terima kasih atas dorongan moril, materil, doa dan kasih sayang yang senantiasa mengiringi setiap langkah penulis;
8. Kakak-adik (Mbak Lia, Rizka, Ridho, Faris, Dana, dan Alan) dan seluruh keluarga besar penulis di Gresik, terima kasih atas dukungan dan motivasi yang selalu mengiringi penulis;
9. Guru-guruku sejak Taman Kanak-kanak (TK) hingga Sekolah Menengah Atas (SMA), dosen, laboran dan segenap civitas akademika yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan saya manusia yang berilmu dan bertakwa;
10. Teman-teman Farmasi angkatan 2013 “Farmasetamol” yang selalu memberikan semangat;
11. Teman seperjuangan skripsi TNMB *crew* (Wahyu, Carin, Niken dan Siti) atas kerja sama dan bantuannya hingga skripsi ini selesai;
12. Teman karib Nada (Virda, Putri, Mirza, Angel, dan Rika) dan Owls (Farda dan In) yang selalu memberikan dorongan motivasi dengan penuh kesabaran;
13. Teman kontrakan Bidadari Surga (Rizka, Nia, Putri dan Ila) yang telah memberikan semangat, keceriaan dan dukungan kepada penulis;
14. Saudara organisasi “MPA Pring Kuning” terutama MADIALOG 16 (Mbulak, Lanjeng, Codot, Wileng, Kecap, Jebol, Mbeng, Pibang, Pager, Korban, Njegigis, Welas, Ketan, Cebong dan Tayeng) yang telah memberikan keceriaan kepada penulis;
15. Seluruh keluarga besar HMI cabang Jember terutama anggota komisariat Teknologi Pertanian HMI cabang Jember dan komisariat (P) Kesehatan (Mas Faris, Kasang heru, Dyah dan Nia) yang telah memberikan banyak pengalaman dan menjadi keluarga selama berada penulis menempuh pendidikan di Kabupaten Jember.

Penulis juga menerima segala saran dan kritik yang membangun dari semua pihak guna kesempurnaan skripsi ini. Selain itu, penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat untuk semuanya.

Jember, 09 Juli 2017

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>.i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>HALAMAN RINGKASAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xviii</b>
<b>DAFTAR PERSAMAAN</b> .....	<b>xix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xx</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 Manfaat</b> .....	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Tinjauan Infeksi</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Tinjauan Bakteri</b> .....	<b>5</b>
2.2.1 Definisi dan struktur .....	<b>5</b>
2.2.2 <i>Bacillus cereus</i> .....	<b>7</b>

<b>2.3 Tinjauan Antibakteri.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Tinjauan <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....</b>	<b>9</b>
2.4.1 Klasifikasi <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	9
2.4.2 Morfologi tumbuhan.....	10
2.4.3 Kegunaan <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	11
<b>2.5 Metode Ekstraksi .....</b>	<b>11</b>
<b>2.6 Skrining Fitokimia .....</b>	<b>12</b>
<b>2.7 Metode Pengujian Antibakteri.....</b>	<b>14</b>
2.7.1 Metode difusi .....	14
2.7.2 Metode dilusi .....	16
2.7.3 Metode bioautografi .....	17
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Alat dan Bahan Penelitian.....</b>	<b>21</b>
3.4.1 Alat .....	21
3.4.2 Bahan .....	21
<b>3.5 Variabel Penelitian.....</b>	<b>21</b>
3.5.1 Variabel bebas .....	21
3.5.2 Variabel terikat .....	22
3.5.3 Variabel terkontrol .....	22
<b>3.5 Definisi Operasional.....</b>	<b>22</b>
<b>3.6 Prosedur Penelitian.....</b>	<b>23</b>
3.6.1 Identifikasi tumbuhan (Determinasi).....	23
3.6.2 Pembuatan simplisia.....	23
3.6.3 Pembuatan ekstrak daun <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	23
3.6.4 Skrining fitokimia.....	24
<b>3.7 Uji Aktivitas Antibakteri.....</b>	<b>27</b>

3.7.1	Pembuatan media.....	27
3.7.2	Penyiapan dan sterilisasi alat dan bahan.....	28
3.7.3	Pembuatan biakan murni .....	29
3.7.4	Peremajaan bakteri uji .....	29
3.7.5	Pembuatan suspensi <i>Bacillus cereus</i> (inokulum) .....	29
3.7.6	Pembuatan kontrol positif dan negatif.....	29
3.7.7	Pembuatan larutan uji .....	29
3.7.8	Penentuan aktivitas antibakteri.....	30
<b>3.8</b>	<b>Analisis Data .....</b>	<b>32</b>
<b>3.9</b>	<b>Skema Kerja .....</b>	<b>34</b>
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Determinasi dan Preparasi Simplisia Daun <i>Hibiscus macrophyllus</i></b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Ekstraksi Daun Waru Gunung (<i>Hibiscus macrophyllus</i>) .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Skrining Fitokimia .....</b>	<b>37</b>
4.3.1	Identifikasi senyawa golongan Alkaloid .....	38
4.3.2	Identifikasi senyawa golongan glikosida saponin, terpenoid dan steroid. ....	41
4.3.3	Identifikasi senyawa golongan flavonoid .....	42
4.3.4	Identifikasi senyawa golongan polifenol dan tanin. ....	43
<b>4.4</b>	<b>Uji Aktivitas Antibakteri.....</b>	<b>43</b>
4.4.1	Metode difusi sumuran .....	43
4.4.2	Metode mikrodilusi.....	47
<b>BAB 5.</b>	<b>PENUTUP.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Kesimpulan.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2</b>	<b>Saran.....</b>	<b>51</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>.....</b>	<b>52</b>
<b>LAMPIRAN</b>	<b>.....</b>	<b>59</b>





**DAFTAR TABEL**

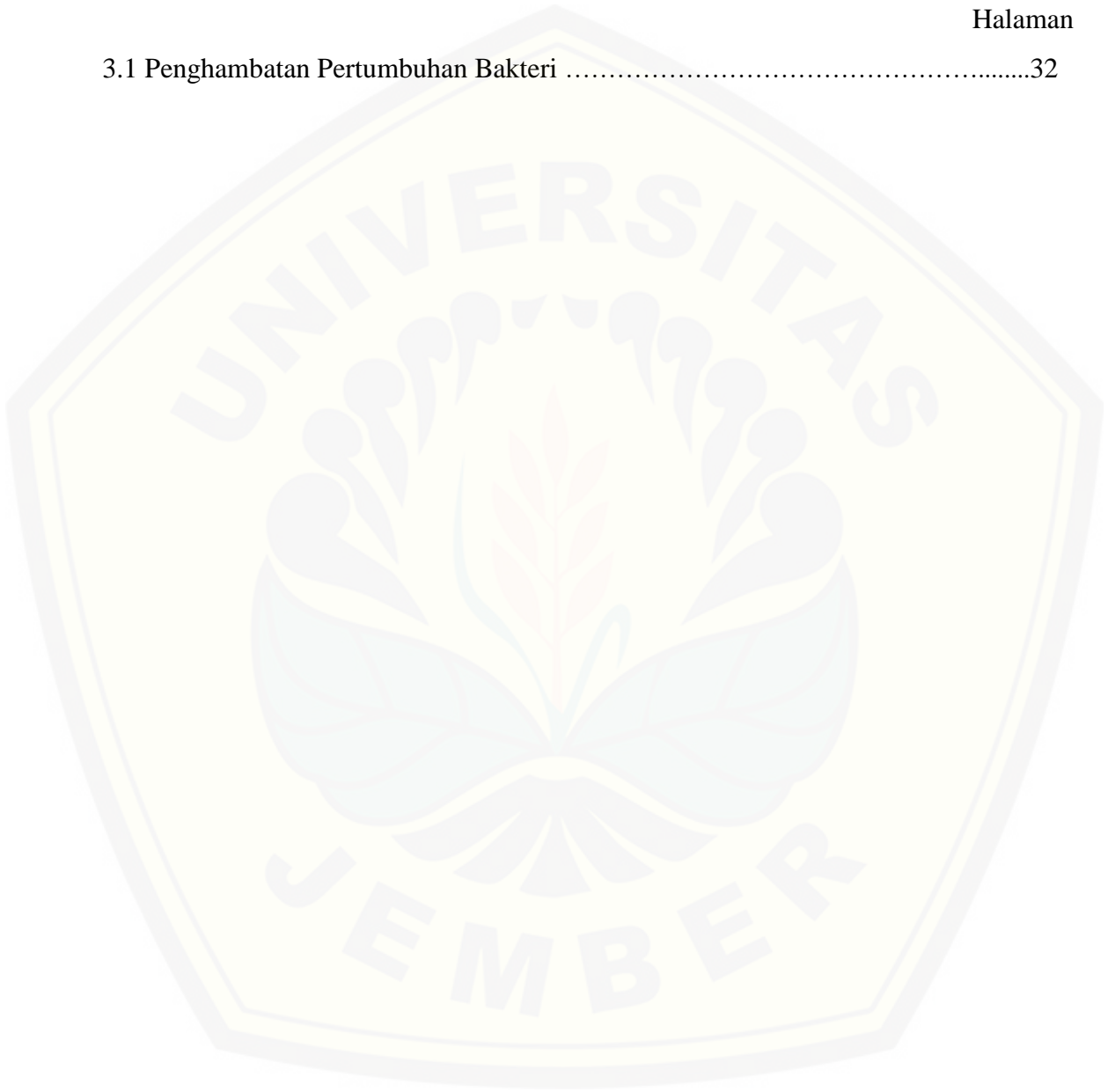
	Halaman
4.1 Hasil Ekstraksi Simplisia Daun <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	37
4.2 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	38
4.3 Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol Daun <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	45
4.4 Rata- rata Penghambatan Ekstrak Etanol Daun <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	48
4.5 Rata-rata KH <sub>50</sub> Ekstrak Etanol Daun <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	49

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur Bakteri.....	6
2.2 Daun <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	10
2.3 Metode Difusi Agar .....	15
2.4 Metode Dilusi (Mikrodilusi) .....	17
3.1 Pengujian Difusi.....	19
3.2 Pengujian Mikrodilusi.....	20
3.3 Desain <i>Microplate 96 wells</i> 1.....	31
3.4 Desain <i>Microplate 96 wells</i> 2.....	32
4.1 Uji Alkaloid dengan Pereaksi Mayer.....	39
4.2 Uji Alkaloid dengan Pereaksi Wagner.....	39
4.3 Uji Alkaloid dengan Pereaksi Dragendroff.....	40
4.4 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Sumuran.....	43

**DAFTAR PERSAMAAN**

	Halaman
3.1 Penghambatan Pertumbuhan Bakteri .....	32



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
4.1 Hasil Determinasi Tumbuhan <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	59
4.2 Data Rendemen Ekstrak Etanol Daun <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	60
4.3 Gambar Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	61
4.4 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun <i>Hibiscus macrophyllus</i> .....	64
4.5 Perhitungan Konsentrasi Gentamisin.....	66
4.6 Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Sumuran.....	68
4.7 Hasil Analisis Statistika Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi.....	69
4.8 Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Metode Mikrodilusi dalam Penentuan $KH_{50}$ .....	71

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Infeksi merupakan salah satu penyebab utama morbiditas, mortalitas dan masalah kesehatan di dunia, terutama di negara berkembang dan tropis, seperti Indonesia. Infeksi perlu mendapatkan perhatian dalam upaya pencegahan dan penanganan terutama infeksi diare dan pneumonia. Hasil riset Kesehatan dasar tahun 2007 menunjukkan bahwa proporsi dua penyakit penyebab kematian terbesar pada bayi postneonatal (29 hari-11 bulan) dan anak balita (1-4 tahun) adalah diare dan pneumonia (Departemen Kesehatan RI, 2008). Berdasarkan data Kementerian Kesehatan RI (2016), hasil rekapitulasi angka kematian dari tahun 2008-2015 akibat infeksi diare meningkat menjadi 2,47% sedangkan akibat infeksi pneumonia pada balita lebih tinggi dibandingkan tahun 2014 sebesar 0,16%, pada kelompok bayi sedikit lebih tinggi sebesar 0,17%. Dari data di atas menunjukkan infeksi diare dan pneumonia masih mengalami peningkatan dari tahun ke tahun.

Sebagian besar penyakit infeksi diare dan pneumonia disebabkan oleh bakteri. Bakteri dapat menyebabkan penyakit dengan memasuki tubuh inang yang selanjutnya bereproduksi atau bereplikasi (Pratiwi, 2009). Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi diare (gastroenteritis) dan pneumonia (infeksi saluran pernafasan) adalah *Bacillus cereus*. *B. cereus* dapat menyebabkan penyakit gastroenteritis berupa mual, muntah dan diare (Todar, 2012). Selain menyebabkan penyakit pada gastroenteritis, *B. cereus* dapat menyebabkan infeksi *non-gastrointestinal* seperti infeksi saluran pernafasan, pneumonia, infeksi nosokomial, *endeophthalmitis*, infeksi *Central Nervous System* (CNS), infeksi saluran kemih, endokarditis dan *gas gangrene-like cutaneous* (Bottone, 2010). Dalam mengatasi infeksi bakteri *B. cereus* diperlukan adanya senyawa antibakteri.

Antibakteri adalah agen yang dapat mencegah atau menghambat pertumbuhan dan proliferasi bakteri. Selain itu, antibakteri juga dapat secara efektif membunuh sel bakteri tertentu (Ivanova dkk., 2015). Saat ini pengobatan

antibakteri yang diberikan pada penderita infeksi dilakukan dengan pemberian obat-obatan sintetik, seperti golongan penisilin, sefalosporin, dan tetrasiklin. Penggunaan obat-obatan sintetik dalam jangka panjang sering kali menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan seperti gangguan saluran cerna, mual, muntah, diare, hingga penyakit gangguan darah (leukopenia, trombositopenia, anemia hemolitik, dan anemia aplastik) (BNF.org, 2010). Selain itu, penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat menimbulkan resistensi. Salah satu strategi untuk mengatasi resistensi bakteri adalah menemukan inovasi antibiotik baru (Devendra, 2011).

Penemuan senyawa aktif baru yang berasal dari tumbuhan merupakan potensi alternatif sebagai sumber agen antibiotik (Wagner dan Ulrich, 2009). Banyak penelitian yang telah membuktikan adanya aktivitas antibiotik yang berasal dari senyawa aktif tumbuhan. Salah satunya adalah pada tumbuhan famili Malvaceae dari genus *Hibiscus*. Pada penelitian Uddin dkk. (2010) menunjukkan bahwa adanya aktivitas antibiotik pada ekstrak etanol daun dan bunga *Hibiscus rosasinensis* menggunakan metode difusi sumuran pada konsentrasi 50 dan 100 mg/mL. Pada penelitian Ramproshad dkk. (2012) menunjukkan bahwa adanya aktivitas antibiotik pada ekstrak etanol daun *H. tiliaceus* menggunakan metode difusi cakram pada konsentrasi 250 dan 500 mg/disk. Pada penelitian Sekar dkk. (2015) menunjukkan bahwa adanya aktivitas antibiotik pada ekstrak metanol daun dan buah *H. sabdariffa* menggunakan metode difusi cakram pada konsentrasi 1000, 500 dan 250 µg/mL. Pada penelitian Bokaeian dkk. (2014) menunjukkan bahwa konsentrasi hambat minimum ekstrak bunga *H. sabdariffa* sebesar 1,25 mg/mL. Dari penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa tumbuhan memiliki potensi sebagai agen antibiotik yang berasal dari kandungan metabolit sekunder yang dimiliki oleh tumbuhan.

Metabolit sekunder merupakan senyawa organik yang tidak terlibat langsung dalam pertumbuhan, perkembangan, atau reproduksi organisme tetapi sering berperan penting dalam pertahanan (Harbone dan Baxter, 1993). Metabolit sekunder terdistribusi hanya pada spesies filogenetik/familia tertentu yang dapat digolongkan pada metabolit sekunder utama yaitu terpenoid, fenil propanoid,

poliketida dan alkaloid (Saifudin, 2014). Pada analisis fitokimia penelitian Sekar dkk. (2015) menunjukkan bahwa ekstrak daun dan buah *H. sabdariffa* mengandung golongan senyawa flavonoid, tanin, triterpenoid, alkaloid, karbohidrat, protein, asam amino, steroid dan glikosida. Pada penelitian Tamboto (2017) menunjukkan bahwa ekstrak bunga *H. rosasinensis* mengandung golongan senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, glikosida, fenol dan saponin yang berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri. Menurut Salem dkk. (2014), golongan senyawa metabolit yang paling berpotensi sebagai agen antibakteri pada *H. tiliaceus* adalah flavonoid, saponin dan polifenolik.

Salah satu tumbuhan dari genus *Hibiscus* yang banyak tersebar di Indonesia adalah *H. macrophyllus*. *H. macrophyllus* dapat dijumpai di Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur, Jawa, dan Sumatera. *H. macrophyllus* sangat cepat tumbuh, umumnya tumbuh secara alami di hutan dataran rendah dan belukar sampai 500 meter di atas permukaan laut (mdpl) (Sastrapradja dkk., 1980). *H. macrophyllus* memiliki hubungan kekerabatan dengan, *H. sabdariffa*, *H. rosasinensis* dan *H. tiliaceus*. Namun belum ditemukan data penelitian mengenai uji aktivitas antibakteri dari *H. macrophyllus*. Berdasarkan prinsip kemotaksonomi dalam genus yang sama maka *H. macrophyllus* diduga memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

Berdasarkan uraian di atas perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan secara ilmiah adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak *H. macrophyllus*. Penelitian ini diawali dengan skrining fitokimia ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* untuk mengetahui golongan senyawa kimia dalam ekstrak etanol daun tersebut. Selanjutnya ekstrak akan diuji menggunakan metode difusi dengan teknik sumuran dan dilusi dengan teknik mikrodilusi. Metode difusi sumuran digunakan untuk mengamati ada tidaknya aktivitas antibakteri yang diukur berdasarkan diameter zona hambat, sedangkan metode mikrodilusi untuk mengetahui konsentrasi hambat 50% (KH<sub>50</sub>) terhadap pertumbuhan *B. cereus*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas, permasalahan yang dapat dirumuskan dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, saponin, steroid, triterpenoid dan/ tanin?
2. Apakah ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. cereus*?
3. Berapa nilai  $KH_{50}$  ekstrak etanol *H. Macrophyllus* terhadap pertumbuhan *B. cereus*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki tujuan antara lain :

1. Untuk mengetahui ada tidaknya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, steroid, triterpenoid dan/ tanin dalam ekstrak etanol daun *H. macrophyllus*.
2. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* terhadap *B. cereus*.
3. Untuk mengetahui nilai  $KH_{50}$  ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* terhadap *B. cereus*.

## 1.4 Manfaat

Adapun manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi mengenai golongan senyawa dalam ekstrak etanol daun *H. macrophyllus*.
2. Memberikan informasi sumber antibakteri baru dan memberikan referensi apabila akan dilakukan penelitian lebih lanjut yang berhubungan dengan aktivitas antibakteri dari ekstrak daun *H. macrophyllus*.
3. Memberikan informasi nilai  $KH_{50}$  ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* terhadap *B. cereus*.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Infeksi

Menurut kamus saku kedokteran Dorland (2009), *infection* atau infeksi adalah invasi dan multiplikasi mikroorganisme di jaringan tubuh, terutama yang menyebabkan cedera selular lokal akibat metabolisme yang kompetitif, replikasi intraselular atau respon antigen-antibodi. Menurut *World Health Organization* (WHO), penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen. Mikroorganisme patogen adalah mikroorganisme yang menyebabkan penyakit pada mikroorganisme atau organisme lain seperti bakteri, virus, parasit atau jamur. Mikroorganisme patogen ini dapat menyebar secara langsung maupun tidak langsung pada inangnya. Menurut Pratiwi (2009), penyebaran penyakit infeksi dimulai saat mikroorganisme memasuki tubuh inang yang selanjutnya bereproduksi atau bereplikasi. Mikroorganisme patogen memasuki tubuh inang melalui berbagai macam jalan, misalnya melalui membran mukosa, kulit, ataupun rute parenteral.

### 2.2 Tinjauan Bakteri

#### 2.2.1 Definisi dan struktur

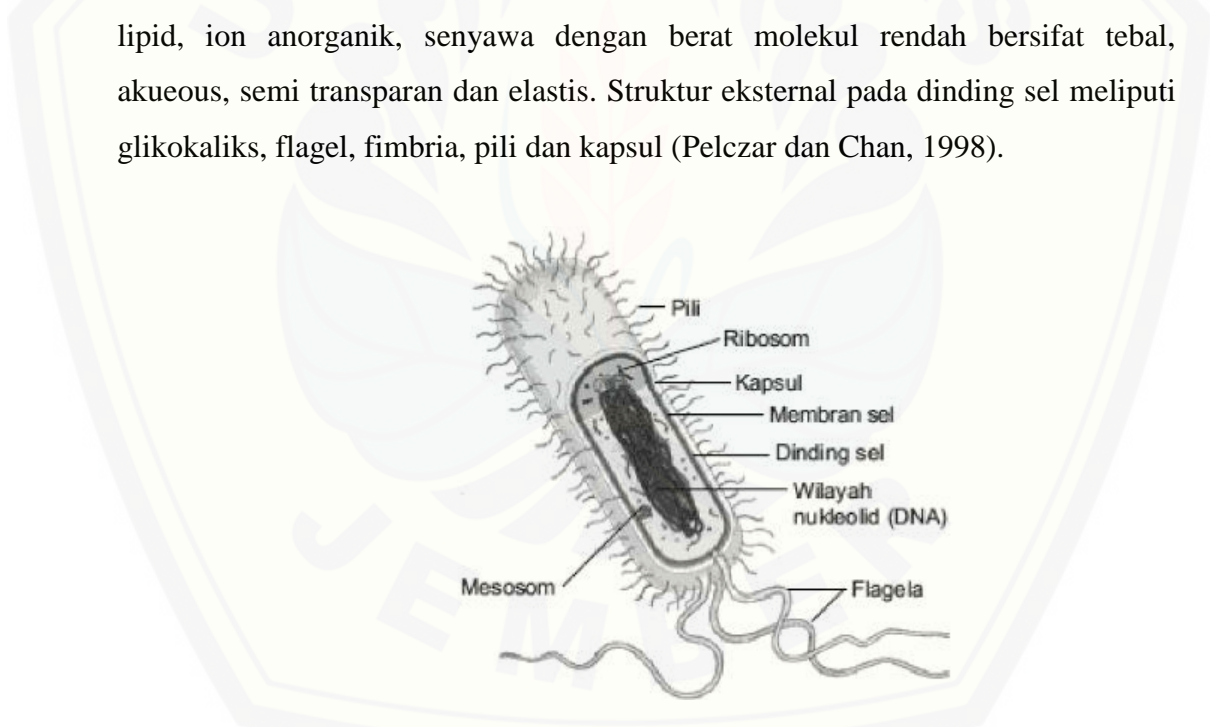
Bakteri merupakan mikroorganisme uniseluler yang termasuk kelas *Schizomycetes*. Pada umumnya bakteri tidak mempunyai klorofil tetapi ada beberapa bakteri yang fotosintetik (Ristiati, 2000). Ukuran sel setiap jenis bakteri bervariasi yang dinyatakan dalam satuan mikron ( $\mu\text{m}$ ). Pada bakteri yang berbentuk bulat berdiameter 0,2-2,0  $\mu\text{m}$  sedangkan bakteri berbentuk batang memiliki panjang 2-10  $\mu\text{m}$  dengan lebar 0,2-1,5  $\mu\text{m}$ . Bakteri terkecil memiliki ukuran 0,15-0,30  $\mu\text{m}$  sedangkan bakteri terbesar memiliki lebar 1,5  $\mu\text{m}$  dan panjang 15  $\mu\text{m}$ . Faktor yang mempengaruhi ukuran sel adalah umur sel, lingkungan dan teknik pewarnaan (Pelczar dan Chan, 1998).

Dinding sel merupakan struktur kompleks, semi kaku dengan tebal 10-23 nm yang mengelilingi membran sitoplasma. Dinding sel berfungsi memberi

bentuk sel dan melindungi isi sel dari pengaruh luar sel. Dinding sel tersusun atas makromolekul peptidoglikan yang terdiri dari disakarida dan polipeptida (Pelczar dan Chan, 1998).

Membran plasma merupakan struktur tipis di bawah dinding sel dan membungkus sitoplasma sel. Membran plasma tersusun atas fosfolipid dan protein membentuk struktur fosfolipid bilayer yang terdiri bagian kepala dan ekor. Pada bagian kepala tersusun dari fosfat dan gliserol, sehingga bersifat hidrofil (polar dan larut air), sedangkan pada bagian ekor tersusun dari asam lemak sehingga bersifat hidrofob (nonpolar dan tidak larut air). Gugus polar pada dua permukaan dan gugus nonpolar pada bagian dalam bilayer (Pelczar dan Chan, 1998). Gambar struktur bakteri dapat dilihat pada gambar 2.1.

Sel dalam membran plasma tersusun atas air (80%), protein, karbohidrat, lipid, ion anorganik, senyawa dengan berat molekul rendah bersifat tebal, akueous, semi transparan dan elastis. Struktur eksternal pada dinding sel meliputi glikokaliks, flagel, fimbria, pili dan kapsul (Pelczar dan Chan, 1998).



Gambar 2.1 Struktur Bakteri (Sumber: Pelczar dan Chan, 1998)

### 2.2.2 *Bacillus cereus*

Klasifikasi *B. cereus* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Posibacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Jenis	: <i>Bacillus cereus</i> (Frankland and Frankland, 1887)

*B. cereus* adalah bakteri Gram positif yang termasuk anaerob fakultatif berbentuk batang, motil, dan spora tahan pemanasan. Biasanya *B. cereus* bersifat mesofilik, tumbuh pada suhu antara 10-50 °C (suhu optimum 28-37 °C) terdapat beberapa strain *B. cereus* yang bersifat psikrotrofik yang tumbuh pada suhu 4 °C. *B. cereus* dapat tumbuh subur pada pH antara 4,3-9,3. aktivitas air ( $a_w$ ) *B. cereus* diatas 0,92. Spora *B. cereus* agak tahan panas (moderat) dan tetap hidup selama pembekuan dan pengeringan (Arisman, 2009).

Ada dua penyakit yang disebabkan oleh *B. cereus* yaitu penyakit emetik dan diare. Emetik sebabkan oleh konsumsi toksin tahan panas yang dihasilkan oleh *B. cereus* dalam makanan. Penyakit diare disebabkan oleh konsumsi moderat *B. cereus* kemudian bakteri memproduksi toksin dalam perut (Al-Baqer dan Badour, 2005). *B. cereus* merupakan bakteri patogen yang menyebabkan gastroenteritis dan berperan penting dalam kejadian keracunan makanan di Eropa, Amerika Utara dan Jepang (Tajkarimi, 2007). Selain menyebabkan penyakit pada gastroenteritis, *B. cereus* dapat menyebabkan infeksi *non-gastrointestinal* seperti infeksi saluran pernafasan, pneumonia, infeksi nosokomial, *endeophthalmitis*, infeksi *Central Nervous System* (CNS), infeksi saluran kemih, endokarditis dan *gas gangrene-like cutaneous* (Bottone, 2010).

### 2.3 Tinjauan Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang bekerja dalam mencegah atau menghambat pertumbuhan dan proliferasi bakteri. Selain itu, antibakteri juga dapat efektif membunuh sel bakteri tertentu (Ivanova dkk., 2015). Aktivitas antibakteri dibagi menjadi 2 macam yaitu aktivitas bakteriostatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen dalam kisaran luas) (Brooks dkk., 2005). Ada beberapa faktor yang mempengaruhi efektivitas kerja zat antibakteri meliputi ukuran volume populasi bakteri, kadar air, suhu, konsentrasi antibakteri, pH dan kandungan bahan organik (Ristiati, 2000).

Secara umum, kerja antibakteri dapat diketahui dengan meninjau struktur serta komposisi sel bakteri. Kerusakan pada salah satu bagian dari sel dapat mengawali perubahan-perubahan yang menyebabkan kematian sel (Ristiati, 2000). Cara kerja bahan antibakteri antara lain merusak dinding sel, mengubah permeabilitas sel, mengubah molekul protein dan asam nukleat, menghambat kerja enzim, serta menghambat sintesis asam nukleat dan protein (Pelczar dan Chan, 1998). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukan atau mengubahnya setelah dibentuk. Permeabilitas sel berpengaruh dalam keluar masuknya bahan-bahan tertentu dalam sel serta memelihara integritas komponen-komponen seluler, bila membran dirusak akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau kematian sel. Pengubahan protein dan asam nukleat dengan cara mendenaturasi dengan cara melibatkan suhu tinggi dan zat kimia dengan konsentrasi pekat dapat mengakibatkan koagulasi pada komponen sel yang bersifat *irreversibel* (tidak dapat kembali). Pada cara penghambatan enzim, banyak zat kimia yang dapat mengganggu reaksi biokimia sehingga mengganggu metabolisme atau matinya sel (Ristiati, 2000).

Antibakteri yang umum digunakan yaitu penisilin, sefalosporin, aminoglikosida. penisilin digolongkan sebagai obat beta-laktam karena mempunyai cincin laktam yang unik dengan empat anggota. Mekanisme kerja dari penisilin yaitu menghambat pertumbuhan bakteri dengan jalan menghambat tahap spesifik dalam sintesis dinding sel. Penisilin secara kimiawi memiliki mekanisme

kerja dan toksisitas yang serupa dengan sefalosporin. Sefalosporin lebih stabil daripada penicillin terhadap banyak bakteri beta-laktamase sehingga mempunyai spektrum lebih luas. Sedangkan aminoglikosida adalah suatu golongan antibiotik bakteriosid yang larut air dan stabil dalam larutan. Aminoglikosida menghambat pertumbuhan bakteri melalui penghambatan sintesis protein *irreversible*. Salah satu golongan aminoglikosida adalah gentamisin. Gentamisin merupakan aminoglikosida yang aktif terhadap organisme Gram positif dan Gram negatif (Katzung, 2004).

## 2.4 Tinjauan *Hibiscus macrophyllus*

### 2.4.1 Klasifikasi *Hibiscus macrophyllus*

Tumbuhan *H. macrophyllus* ditunjukkan pada Gambar 2.2 dan klasifikasinya adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Super Divisi	: Embryophyta
Divisi	: Tracheophyta
Sub Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Super Ordo	: Rosales
Ordo	: Malvales
Famili	: Malvaceae
Genus	: <i>Hibiscus</i>
Jenis	: <i>Hibiscus macrophyllus</i> Roxb. ex Hornem (Dorr, 2012)

### 2.4.2 Nama daerah *Hibiscus macrophyllus*

*H. macrophyllus* memiliki nama lokal yang berbeda-beda dari tiap daerah. penamaan berasal dari Sumatra yaitu waru (melayu), Jawa yaitu waru gunung dan tisuk (Sunda); waru gombang, waru kopek, waru rangkang (Jawa), serta dari Madura yaitu baru kheucheu (Departemen Kesehatan, 1980).

#### 2.4.3 Ekologi dan penyebaran tumbuhan

*H. macrophyllus* merupakan tumbuhan yang tumbuh sangat cepat dan dapat ditanam dengan biji. Pembungaan dan pembuahan *H. macrophyllus* mulai bulan Juni dan berakhir bulan Februari. *H. macrophyllus* tumbuh secara alami di hutan dataran rendah dan belukar sampai 500 mdpl. Di Jawa, *H. macrophyllus* ditanam di kebun pada ketinggian dari 0-1400 mdpl. Di Indonesia, *H. macrophyllus* dijumpai di Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur, Jawa, dan Sumatera. Di luar Indonesia, *H. macrophyllus* dapat dijumpai di Indochina, India, dan Semenanjung Malaya. (Sastrapradja dkk., 1980).

#### 2.4.4 Morfologi tumbuhan

Pohon dengan ketinggian hingga 20 meter. Batang silindris, berwarna putih keabu-abuan dan seluruh permukaannya berbulu halus. Daun seperti bangun jantung, ujung lancip dan pangkal melengkuk ke dalam. Kuncup muda terlindung oleh daun penumpu. Helaiian daun berwarna hijau kecoklatan, permukaan yang berbulu, tepi bergerigi, diameter daun 20-40 cm yang dilengkapi dengan tangkai daun berukuran 15-25 cm. bunga tersusun dalam karangan di ujung percabangan, kelopak berwarna hijau kecoklatan, mahkota bunga berwarna kuning dengan diameter 5-7 cm. Buah kotak dengan panjang 3-4 cm, apabila buah masak akan pecah. Biji berwarna coklat dan relatif kecil (Qomah, 2015).



Gambar 2.2 Daun *Hibiscus macrophyllus* (Sumber: Dokumentasi Pribadi)

#### 2.4.5 Kegunaan *Hibiscus macrophyllus*

Di Hawaii dan Palawan (Filipina) *H. macrophyllus* dimanfaatkan sebagai tanaman hias (Sastrapradja dkk., 1980). Di Jawa, kayu *H. macrophyllus* dimanfaatkan untuk bahan baku rumah dan bangunan lain, terutama kayu yang lurus dan panjang (Heyne, 1987). Menurut Salem dkk. (2014), pada daun dan bunga genus *Hibiscus* memiliki aktivitas antioksidan, antitirosinase dan antibakteri.

### 2.5 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah penarikan kandungan kimia yang larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, fenol. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Departemen Kesehatan RI, 2000).

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan masa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Departemen Kesehatan RI, 2000).

Ada beberapa cara metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut yaitu:

1. Cara Dingin
  - a. Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.
  - b. Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada

temperatur ruangan. Prosesnya terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahapan maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Departemen Kesehatan RI, 2000).

## 2. Cara Panas

- a. Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga proses ekstraksi sempurna.
- b. Soxhletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstrak kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
- c. Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur kamar yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50 °C.
- d. Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air 96-98 °C (bejana infus tercelup dengan penangas air mendidih selama 15-20 menit).
- e. Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ( $\geq 30$  menit) dan temperatur sampai titik didih air (Departemen Kesehatan RI, 2000).

### 2.6 Skrining Fitokimia

Kandungan senyawa metabolit sekunder dalam suatu tanaman dapat diketahui dengan suatu pendekatan yang dapat memberikan informasi adanya senyawa metabolit sekunder. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah metode skrining fitokimia (Setyowati dkk., 2014). Skrining fitokimia merupakan uji kualitatif kandungan senyawa kimia dalam bagian tumbuhan. Skrining fitokimia harus memenuhi beberapa persyaratan antara lain sederhana, cepat dapat dilakukan dengan peralatan minimal, bersifat semikuantitatif yaitu memiliki batas kepekaan untuk senyawa yang bersangkutan, selektif terhadap golongan senyawa yang dipelajari (Septyaningsih, 2010). Analisis kualitatif untuk mengetahui



golongan senyawa dapat dilakukan dengan melakukan uji tabung berupa reaksi warna, pengendapan dan atau melalui uji penegasan kromatografi lapis tipis (KLT). Berikut beberapa deteksi senyawa metabolit sekunder.

a. Deteksi senyawa alkaloid

Menurut Nafisah dkk. (2014), pengujian senyawa alkaloid dilakukan dengan 3 reagen yaitu reagen Meyer, Wagner dan Dragendorff. Pada pereaksi Meyer, nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam  $K^+$  dari kalium tetraiodomercurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Pada pereaksi Wagner, dijelaskan bahwa ion logam  $K^+$  membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan alkaloid sehingga membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Pada pereaksi Dragendorff, ion logam  $K^+$  membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan alkaloid sehingga membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Adanya alkaloid masing-masing ditandai dengan terbentuknya endapan secara berturut-turut putih, coklat, dan jingga.

b. Deteksi senyawa saponin

Pada umumnya menggunakan metode Forth. Timbulnya busa dan buih merupakan cara sederhana untuk mengetahui adanya saponin. Timbulnya buih pada uji Forth menunjukkan adanya glikosida dalam ekstrak tersebut yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Uji saponin ini menunjukkan hasil positif bila setelah dikocok dan didiamkan ada busa yang stabil/bertahan selama 2-4 menit (Nafisah dkk., 2014).

c. Deteksi senyawa glikosida

Deteksi adanya glikosida dapat dilakukan melalui uji Borntrager dimodifikasi dan uji Law's. Pada pengujian menggunakan Borntrager dimodifikasi, pembentukan warna merah muda dilapisan amoniak menunjukkan adanya glikosida antranol. Sedangkan uji Law's terbentuk warna merah muda hingga merah darah menunjukkan adanya glikosida jantung (Tiwari dkk., 2011).

d. Deteksi tanin

Tanin termasuk dalam golongan fenolik yang mengandung kerangka cincin aromatik yang mengandung gugus hidroksil (OH). Perubahan warna terjadi

ketika penambahan  $\text{FeCl}_3$  yang bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil pada senyawa tanin, penambahan  $\text{FeCl}_3$  pada ekstrak uji menghasilkan warna hijau kehitaman yang menunjukkan mengandung senyawa tanin (Dewi dkk., 2013).

e. Deteksi flavonoid

Flavonoid dapat diidentifikasi melalui uji alkalin dan uji asetat. Uji alkalin dengan menggunakan larutan natrium hidroksida. Pembentukan warna kuning intensif dengan penambahan asam encer menunjukkan adanya flavonoid. Uji asetat dengan larutan timbal asetat. Pembentukan warna endapan kuning menunjukkan adanya flavonoid.

f. Deteksi terpenoid atau steroid

Uji yang banyak digunakan untuk mengetahui kandungan steroid/ triterpenoid adalah Liebermann Burchard yang dengan kebanyakan sterol dan triterpen memberikan warna biru dan hijau (Nafisah dkk., 2014).

Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu cara identifikasi senyawa. KLT digunakan untuk pemisahan zat secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serta rata pada lempeng (Departemen Kesehatan RI, 1989). KLT umumnya lebih banyak digunakan untuk tujuan identifikasi, karena mudah dan sederhana serta memberikan pilihan fase diam yang lebih luas dan berguna untuk pemisahan masing-masing senyawa (Departemen Kesehatan RI, 2008)

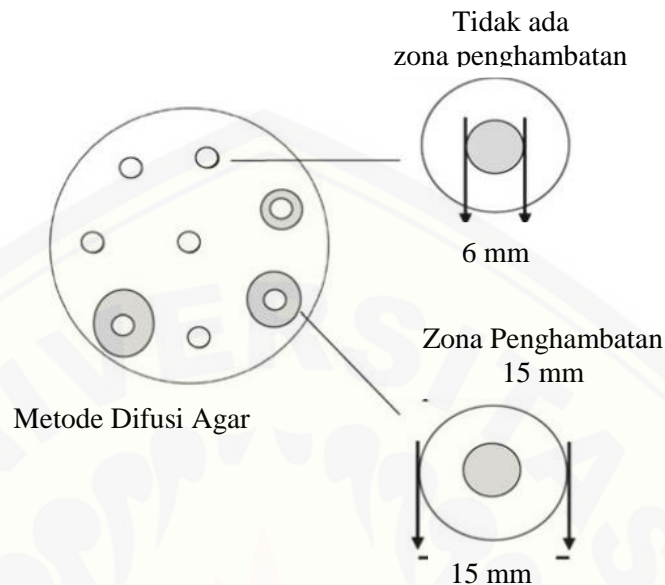
## 2.7 Metode Pengujian Antibakteri

Uji antibakteri dan antifungi secara garis besar terbagi menjadi tiga kelompok besar yaitu difusi, dilusi dan bioautografi (Cos dkk., 2006). Berikut beberapa penjelasan mengenai metode uji aktivitas antibakteri.

### 2.7.1 Metode difusi

Pada metode difusi, senyawa uji pada konsentrasi tertentu dimasukkan pada media yang telah diinokulasi dengan bakteri, selanjutnya diukur zona hambat pada akhir inkubasi. Hasil inokulasi disimpan pada suhu yang lebih rendah selama

beberapa jam agar meningkatkan difusi dan diameter zona hambat penghambatan (Cos dkk., 2006). Macam-macam metode difusi sebagai berikut.



Gambar 2.3 Metode Difusi Agar (Sumber: Lima-Filho dan Cordeiro, 2014)

a. Metode difusi cakram

Metode difusi cakram disahkan oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) yang digunakan untuk menguji aktivitas antimikroba dari bakteri dan ragi. Pengujian difusi ini menggunakan kertas cakram yang dimasukkan ke dalam media padat yang berisi kultur bakteri (Filho dan Cordeiro, 2014). Agen antibakteri berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan bakteri (Balouiri dkk., 2016). Pengujian ini untuk mendeteksi sensitivitas atau resistensi bakteri patogen fakultatif aerob dan anaerob (Filho dan Cordeiro, 2014).

b. Metode difusi sumuran

Metode difusi sumuran secara umum digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri dari ekstrak tumbuhan. Prosedur yang digunakan sama dengan metode difusi cakram, permukaan atas agar media padat diinokulasi dengan menggosokkan okulum bakteri. Kemudian dibuat lubang dengan diameter 6 sampai 10 mm secara aseptik dengan jarum ose steril atau tip. lalu ditambahkan agen antibakteri atau larutan ekstrak pada konsentrasi yang diinginkan dengan volume (20-100  $\mu\text{L}$ ) ke dalam sumur. Kemudian cawan agar diinkubasi dalam

kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji. Agen antibakteri akan berdifusi dalam media agar dan menghambat pertumbuhan strain bakteri yang diuji (Balouiri dkk., 2016).

c. Metode *agar plug diffusion*

Metode *Agar plug diffusion* sering digunakan untuk membedakan mikroorganisme. Metode ini sama dengan metode difusi cakram, strain bakteri dibiakkan pada media yang sesuai dengan menggoreskan pada permukaan cawan. Selama pertumbuhan, bakteri mensekresikan molekul yang dapat berdifusi dalam media agar. Setelah diinkubasi, sebuah media agar silinder dipotong secara aseptis dengan *cork borer steril* dan diendapkan pada permukaan agar dari cawan lain yang sebelumnya diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Zat berdifusi pada media agar. Kemudian aktivitas antibakteri dari molekul bakteri yang disekresi akan terdeteksi dengan adanya zona hambat pada sekitar *Agar plug* (Balouiri dkk., 2016).

### 2.7.2 Metode dilusi

Metode dilusi adalah metode yang paling tepat sebagai penentuan nilai konsentrasi hambat karena memungkinkan untuk memperkirakan konsentrasi agen antibakteri pada media agar atau kaldu. Metode dilusi kaldu dapat digunakan untuk mengukur secara kuantitatif aktivitas antibakteri secara *in vitro* terhadap bakteri dan jamur. Nilai konsentrasi hambat didefinisikan sebagai konsentrasi antibakteri uji yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Balouiri dkk., 2016).

Sebelum diinokulasi dengan mikroorganisme, senyawa uji pada metode dilusi dicampur dengan media yang sesuai. Metode ini dapat dilakukan dalam media cair maupun media padat. Pada metode dilusi ditunjukkan hasil kekeruhan yang dapat dilihat secara visual atau diperoleh lebih akurat dengan mengukur densitasnya. Namun, sampel uji yang tidak larut sempurna kemungkinan mengganggu pembacaan kekeruhan (Cos dkk., 2006).

Metode dilusi berdasarkan perbenihan cair dapat dibagi menjadi dua yaitu mikrodilusi dan makrodilusi. Menurut Soleha (2015), prinsip pengerjaan mikrodilusi dan makrodilusi adalah sama. Perbedaan kedua metode dilusi tersebut terletak pada volumenya. Untuk makrodilusi volume yang digunakan lebih dari 1 mL, sedangkan mikrodilusi volume yang digunakan 0,05 mL sampai 0,1 mL. Antibakteri yang digunakan disediakan pada berbagai macam pengenceran biasanya dalam satuan  $\mu\text{g/mL}$ . Mikrodilusi merupakan teknik yang lebih menguntungkan dibandingkan makrodilusi karena lebih ekonomis dari segi bahan yang dipergunakan (Filho dan Cordeiro, 2014).



Gambar 2.4 Metode Dilusi (Mikrodilusi) (Sumber: Balouiri dkk., 2016)

### 2.7.3 Metode bioautografi

Pada metode bioautografi, kromatografi lapis tipis dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Kemudian, bioautogram diinkubasi pada 25 °C selama 48 jam di bawah kondisi lembab. Untuk visualisasi pertumbuhan bakteri, sering menggunakan garam tetrazolium. Garam-garam ini mengalami konversi warna dengan dehidrogenase dari sel-sel hidup. Reagen p-iodonitrotetrazolium violet adalah reagen deteksi yang paling cocok. Garam-garam ini disemprotkan ke bioautogram, yang diinkubasi pada 25 °C selama 24 jam atau pada 37 °C selama 3-4 hari. Penggunaan *Mueller Hinton Broth* dapat memberikan media cair yang cukup untuk memungkinkan aderen atau penempelan pelat KLT dan menjaga kelembaban yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri. Bioautografi dapat langsung

dimanfaatkan dengan baik untuk jamur atau bakteri. Metode ini adalah teknik paling mudah untuk mendeteksi zat antijamur dan memberikan hasil yang konsisten untuk jamur penghasil spora seperti aspergillus, penicillium dan cladosporium (Balouiri dkk., 2016).



### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

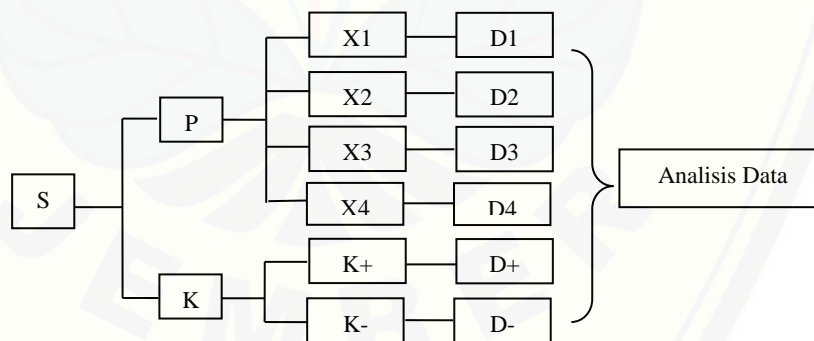
Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true experimental laboratories* yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa, aktivitas antibakteri dan  $KH_{50}$  ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* terhadap *B. cereus*.

#### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Mikrobiologi bagian Biologi Farmasi serta Laboratorium Analisis Instrumen Fakultas Farmasi Universitas Jember pada bulan April hingga Juni tahun 2017.

#### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah *the post test control only group design*. Rancangan penelitian ini terbagi menjadi dua pengujian yaitu uji difusi dan mikrodilusi. Pada uji difusi diukur diameter zona hambat sedangkan pada uji mikrodilusi diukur nilai  $KH_{50}$ . Rancangan penelitian ditunjukkan pada gambar 3.1 dan 3.2



Gambar 3.5 Pengujian Difusi

Keterangan :

S = Sampel

P = Kelompok perlakuan

K = Kelompok kontrol

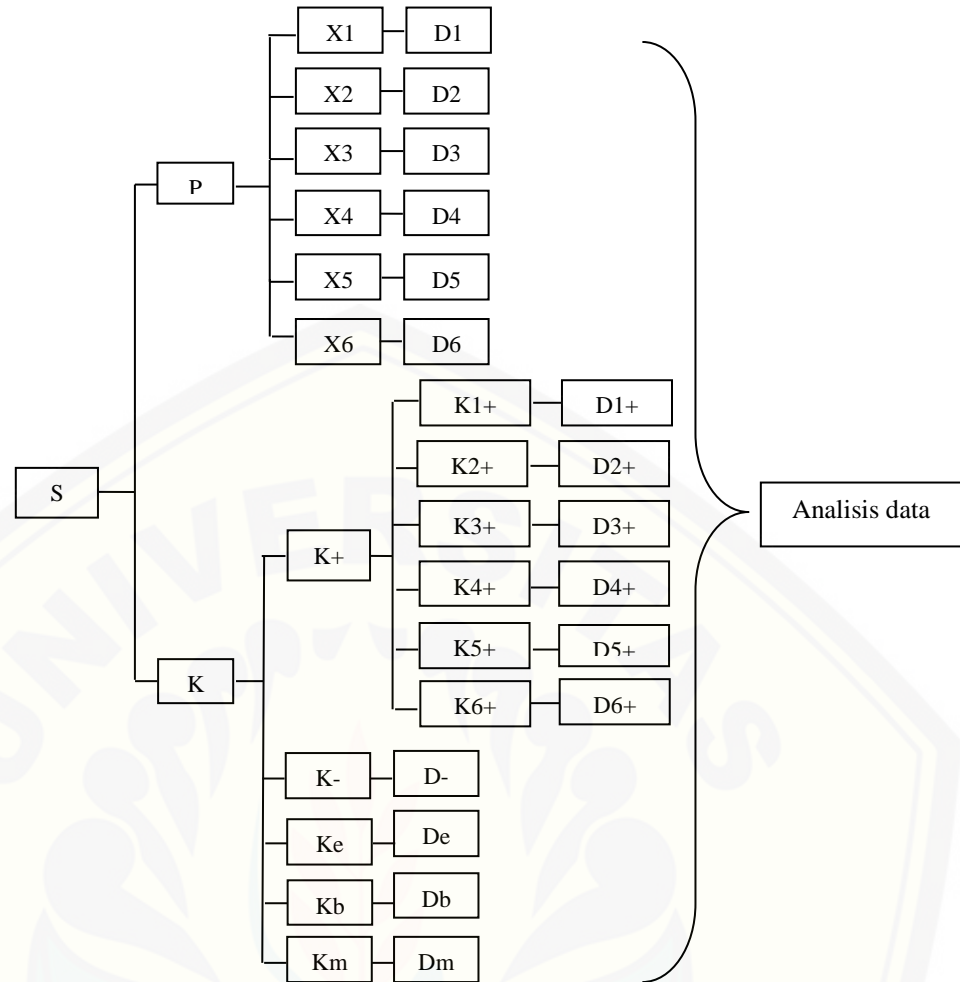
X1-X4 = Konsentrasi larutan sampel berturut-turut  
5% (50 mg/mL), 10% (100 mg/mL), 25%  
(250 mg/mL) dan 50% (500 mg/mL)

K+ = Kontrol positif yaitu antibiotik  
(gentamisin)

K- = Kontrol negatif yaitu akuades steril

D1-D4 = Hasil data larutan uji

D+ = Hasil data kontrol positif



Gambar 3.6 Pengujian Mikrodilusi

Keterangan :

- |       |   |           |                       |
|-------|---|-----------|-----------------------|
| S     | = Sampel  | Km        | = Kontrol media       |
| P     | = Kelompok perlakuan  | K-        | = Kontrol negatif     |
| K     | = Kelompok kontrol  | Ke        | = Kontrol ekstrak     |
| X1-X6 | = Konsentrasi larutan sampel berturut-turut 500,0 µg/mL; 250,0 µg/mL; 125,0 µg/mL; 62,50 µg/mL, 31,25 µg/mL dan 15,63 µg/mL       | D1-D6     | = Hasil data X1- X6   |
| K+    | =Kontrol positif yaitu antibiotik (gentamisin) konsentrasi 8,0 µg/mL; 4,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 1,0 µg/mL; 0,50 µg/mL; dan 0,25 µg/mL | D1+ - D6+ | = Hasil data K1+ -K6+ |
| Kb    | = Kontrol <i>B. cereus</i>  | D+        | = Hasil data K+       |
|       |   | D-        | = Hasil data K-       |
|       |   | De        | = Hasil data Ke       |
|       |   | Db        | = Hasil data Kb       |
|       |   | Dm        | = Hasil data Km       |



### 3.4 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.4.1 Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu *microplate reader*, timbangan analitik (Sartorius CP224S), *blender*, oven (Memmert), serangkaian *rotary evaporator* (N-1000 EYELA), seperangkat alat gelas, spatula logam, pinset, rak tabung reaksi, jarum ose, bunsen, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, *microtip*, *microtube*, vortex (Labnet), *aluminium foil* (Klin-pak), kertas saring, *waterbath*, desikator, autoklaf (ALP), *micropipet* (SOCOREX ASBA S.A), *microplate 96 wells*, *steril cork borer*, *swab*, Jangka sorong, *laminar air flow* (Airtech) dan inkubator (Gallenkamp).

#### 3.4.2 Bahan

Tanaman yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun *H. macrophyllus* yang diambil dari Taman Nasional Meru Betiri (TNMB) wilayah Jember. Media pertumbuhan yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA), *Trythton Soy Broth* (TSB) dan *Mueller Hinton Agar* (MHA). Bakteri uji yang digunakan adalah *B. cereus* ATTC 11778. Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah etanol 96%. Bahan kimia yang digunakan untuk skrining fitokimia adalah air, HCl encer, HCl Pekat, etanol 70%, serbuk magnesium, etil asetat, metanol, butanol, kloroform, asetat anhidrad, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, gelatin, aseton, toluen dan FeCl<sub>3</sub>.

Bahan kimia yang digunakan untuk uji antibakteri diantaranya akuades steril, tween 80 2%, Dimetil Sulfoksida (DMSO) 10%, NaCl fisiologis 0,9%, McFarland 0,5 (BaCl<sub>2</sub> 1% dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%). Antibakteri pembanding yang digunakan adalah sediaan gentasimin injeksi 40.000 µg/mL.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi menggunakan ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* dalam empat konsentrasi yaitu 5% (50 mg/mL), 10% (100 mg/mL), 25% (250 mg/mL) dan 50% (500 mg/mL) sedangkan konsentrasi metode mikrodilusi yang menggunakan enam konsentrasi

yaitu 500,0 µg/mL; 250,0 µg/mL; 125,0 µg/mL; 62,50 µg/mL dan 31,25 µg/mL dan 15,63 µg/mL.

### 3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini untuk uji antibakteri pada ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* terhadap *B. cereus* adalah diameter zona hambat hasil dari metode difusi sumuran yang diukur secara manual dan nilai  $KH_{50}$  yang diperoleh dari metode mikrodilusi dengan mengolah data hasil kekeruhan dari *microplate reader* setelah diinkubasi selama 18-24 jam.

### 3.5.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah ekstrak daun *H. macrophyllus* yang dimaserasi dengan etanol 96%, media pada metode difusi (MHA), media pada metode mikrodilusi (TSB), waktu inkubasi, prosedur penelitian, cara pengukuran untuk uji antibakteri, prosedur pengujian, *microplate 96 wells*.

## 3.5 Definisi Operasional

Berikut definisi operasional dari penelitian ini:

1. Daun *H. macrophyllus* diambil secara acak dari Taman Nasional Meru Betiri (TNMB) wilayah Jember pada bulan September 2016.
2. Ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* adalah daun *H. macrophyllus* yang diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.
3. Identifikasi golongan senyawa dari ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* menggunakan metode uji tabung untuk mengetahui golongan senyawa yang akan diuji.
4. Daya hambat ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* adalah kemampuan ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* menghambat pertumbuhan bakteri. Daya hambat dinyatakan sebagai diameter zona hambat. Diameter hambatan diukur berdasarkan zona bening disekitar sumuran dengan menggunakan alat bantu jangka sorong dikurangi diameter sumuran.

5.  $KH_{50}$  adalah konsentrasi hambat yang mampu menghambat 50% pertumbuhan mikroorganisme. Nilai  $KH_{50}$  dapat diukur dengan mengolah data hasil kekeruhan (*turbidity*) dengan menggunakan *microplate reader*.

### 3.6 Prosedur Penelitian

Prosedur kerja penelitian mulai dari persiapan bahan hingga pengujian meliputi tahap-tahap sebagai berikut:

#### 3.6.1 Identifikasi tumbuhan (Determinasi)

Determinasi tumbuhan *H. macrophyllus* dilakukan oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi Pasuruan. Determinasi dilakukan untuk membuktikan bahwa dalam pengambilan bahan utama yang akan digunakan pada uji aktivitas antibakteri adalah valid.

#### 3.6.2 Pembuatan simplisia

Daun segar *H. macrophyllus* yang dipilih secara acak. Daun *H. macrophyllus* disortir terlebih dahulu untuk memisahkan bagian daun yang kurang baik. Setelah itu daun dicuci untuk menghilangkan pengotor yang melekat kemudian daun dirajang untuk mempermudah proses pengeringan dan penggilingan. Daun kemudian dikeringkan pada udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari secara langsung sampai diperoleh simplisia *H. macrophyllus*. Setelah itu, simplisia daun *H. macrophyllus* dihaluskan menggunakan *blender* sampai terbentuk serbuk. Serbuk yang diperoleh ditimbang sebanyak 250 gram untuk dilakukan proses ekstraksi.

#### 3.6.3 Pembuatan ekstrak daun *Hibiscus macrophyllus*

Ekstraksi dilakukan dengan cara remaserasi. Serbuk sampel sebanyak 250 gram dimasukkan dalam maserator kemudian direndam dengan pelarut etanol 96% (perbandingan 1:8) sebanyak 2 liter selama 5 hari dengan pengadukan setiap 24 jam. Selanjutnya maserat diperas dan dipisahkan dari residunya menggunakan

kertas saring dan corong *buchner*. Hasil filtrat yang telah disaring selanjutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk memisahkan antara pelarut dan senyawa kimia yang tertarik oleh pelarut. Setelah itu, ekstrak diuapkan dalam oven pada suhu 45 °C sedangkan residu dimasukkan kembali ke dalam maserator kemudian ditambahkan 1 liter pelarut dari pelarut hasil evaporator untuk dilakukan remaserasi.

#### 3.6.4 Skrining fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa atau golongan senyawa dalam ekstrak. Pada penelitian ini dilakukan skrining fitokimia yang dilakukan berdasarkan Ningsih dkk. (2015) adalah sebagai berikut:

##### a. Identifikasi senyawa golongan alkaloid

##### 1) Identifikasi dengan reaksi warna

Sebanyak 0,3 gram ekstrak diletakkan dalam tabung reaksi kemudian dimasukkan 5 mL HCl 2N, sampel diaduk dan didinginkan pada temperatur ruang. Setelah sampel dingin ditambahkan NaCl sebanyak 0,3 gram lalu diaduk dan disaring. Filtrat hasil penyaringan ditambah 5 mL HCl 2N, kemudian dibagi menjadi 3 bagian A, B, C dan D. Tiga larutan A, B, dan C ditambahkan berturut-turut pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendroff. Jika ada endapan putih untuk larutan A, coklat muda untuk larutan B dan kuning kecoklatan untuk larutan C menunjukkan adanya alkaloid.

##### 2) Identifikasi dengan KLT

Larutan D ditambahkan  $\text{NH}_4\text{OH}$  28% sampai larutan menjadi basa. kemudian sampel diekstraksi dengan 5 mL kloroform bebas air. Kemudian sampel disaring dan filtrat hasil saringan diuapkan sampai kering. Lalu sisa filtrat dilarutkan dalam metanol, siap untuk pemeriksaan dengan KLT pada kondisi:

Fase diam = keisel gel GF 254

Fase gerak = etil asetat : metanol : air (9:2:2)

Penampak noda = pereaksi Dragendroff

Jika timbul warna jingga menunjukkan adanya alkaloid dalam ekstrak.

b. Identifikasi senyawa golongan glikosida saponin, triterpenoid dan steroid

1) Identifikasi dengan uji buih

Ekstrak sebanyak 0,3 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air suling sebanyak 10 mL, kemudian campuran tersebut dikocok selama 30 detik. Jika berbentuk busa yang tidak hilang selama 30 menit dengan tinggi 3 cm di atas permukaan cairan, maka ekstrak mengandung saponin.

2) Identifikasi dengan reaksi warna

Sebanyak 0,3 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 mL etanol, kemudian larutan dibagi menjadi 3 bagian A, B, dan C masing-masing sebanyak 5 mL. Larutan A digunakan sebagai blanko sedangkan larutan lain dilakukan pengujian dengan cara sebagai berikut:

a) Uji Lieberman-Burchard

Pada larutan B ditambahkan 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes  $H_2SO_4$  pekat, lalu dikocok dengan perlahan dan diamati terjadinya perubahan warna. Senyawa triterenoid dan steroid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam yang diberikan sejumlah reaksi warna. Terjadinya warna hijau biru menunjukkan adanya saponin steroid, sedangkan warna merah ungu menunjukkan adanya triterpen steroid dan warna kuning muda menunjukkan adanya saponin jenuh.

b) Uji Salkowski

Pada larutan C sebanyak ditambahkan 1-2 mL  $H_2SO_4$  pekat secara perlahan melalui dinding tabung reaksi. Adanya steroid tak jenuh ditandai dengan timbulnya cincin berwarna merah.

3) Identifikasi dengan menggunakan KLT

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambah 5 ml HCL 2N, dididihkan dan tutup corong berisi kapas basah selama 2 jam untuk menghidrolisis saponin. Larutan didinginkan dan dinetralkan dengan ammonia. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan 3 mL n-heksana sebanyak 3 kali. Selanjutnya larutan diuapkan sampai 0,5 mL lalu ditotolkan pada pelat KLT dengan kondisi :

Fase diam = keisel gel GF 254

Fase gerak = n-heksana : etil asetat (4:1)

Penampak noda = anisaldehyda asam sulfat, dipanaskan.

Jika terjadi perubahan warna merah ungu menunjukkan adanya saponin triterpenoid.

c. Identifikasi senyawa golongan flavonoid

Sebanyak 0,3 gram ekstrak dikocok dengan 3 mL *n*-heksana sampai ekstrak *n*-heksana tidak berwarna. Filtrat dilarutkan dengan etanol kemudian dibagi menjadi 4 bagian A, B, C dan D. larutan A digunakan sebagai blanko sedangkan larutan lain dilakukan pengujian dengan cara sebagai berikut:

1) Identifikasi dengan reaksi warna

a) Uji Bate-Smith dan Metealf

Pada larutan B ditambahkan HCl pekat sebanyak 0,5 mL untuk menghidrolisis flavonoid menjadi bentuk aglikonnya yaitu *o*-glikosil selanjutnya diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan diamati kembali perubahan warna yang terjadi. Bila perlahan-lahan menjadi warna terang atau ungu menunjukkan adanya senyawa leukoantosianin (dibandingkan dengan blanko).

b) Uji Wilstater

Pada larutan C ditambahkan HCl pekat sebanyak 0,5 mL dan 4 potong magnesium. Penambahan HCl pekat dan magnesium bertujuan untuk mereduksi senyawa flavonoid sehingga menghasilkan kompleks flavilium yang memiliki warna merah atau jingga. Tahap selanjutnya senyawa diencerkan dengan air suling dan ditambahkan 1 mL butanol. Diamati warna yang terjadi disetiap lapisan. Perubahan warna jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan adanya flavonol dan merah tua menunjukkan adanya flavanon.

2) Identifikasi dengan KLT

Larutan D totolkan pada fase diam. Uji KLT dengan kondisi:

Fase diam = keisel gel GF 254

Fase gerak = butanol : asam asetat glacial : air (4:1:5)

Penampak noda = uap ammonia

Jika terdapat noda kuning intensif maka menunjukkan adanya flavonoid

d. Identifikasi senyawa golongan polifenol dan tanin

Sebanyak 0,3 gram ekstrak dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL akuades panas kemudian diaduk dan dibiarkan hingga temperatur kamar. Sampel ditambahkan 3-4 tetes 10% NaCl selanjutnya diaduk dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian masing-masing  $\pm$  4 mL yaitu A, B, dan C. Larutan A digunakan sebagai blanko sedangkan larutan lain dilakukan pengujian dengan cara sebagai berikut:

1) Uji Gelatin

Pada larutan B ditambahkan dengan sedikit gelatin dan 5 mL larutan NaCl 10%. Jika terjadi endapan putih setelah penambahan gelatin menunjukkan adanya tanin.

2) Uji Ferriklorida

Pada Larutan C diberi beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$ , kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Jika terjadi perubahan warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin. Jika pada penambahan gelatin dan NaCl tidak timbul endapan, tetapi ditambahkan dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  menimbulkan warna hijau biru hingga hitam menunjukkan adanya senyawa polifenol.

3) Identifikasi KLT

Larutan A totolkan pada fase diam. Uji KLT dengan kondisi:

Fase diam = keisel gel GF 254

Fase gerak = toluen : aseton : asam formiat (6:6:1)

Penampak noda =  $\text{FeCl}_3$

Jika terdapat noda coklat tua maka menunjukkan adanya polifenol

### 3.7 Uji Aktivitas Antibakteri

#### 3.7.1 Pembuatan media

a. *Nutrien Agar* (NA)

Pembuatan media NA digunakan untuk media peremajaan dan biakan bakteri. Sebanyak 0,5 gram NA dicampurkan dengan 50 mL akuades steril dalam tabung erlenmeyer. Selanjutnya media dipanaskan hingga mendidih dan larut.

Setelah larut, sebanyak 15 mL media NA dituangkan pada cawan petri steril untuk media peremajaan bakteri sedangkan sebanyak 5 mL media NA dituangkan pada tabung reaksi steril untuk media biakan bakteri. Kemudian media NA disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Lalu media NA didinginkan dan dimasukkan ke dalam lemari es. Media NA dalam tabung reaksi dimiringkan 30-45° agar terbentuk media agar miring.

b. *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Pembuatan media MHA digunakan untuk membuat media sumuran. Sebanyak 1,83 gram MHA dicampurkan dengan 50 mL akuades steril dalam tabung erlenmeyer. Selanjutnya media MHA diaduk dan dipanaskan hingga mendidih dan larut, Kemudian media MHA disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah selesai, media MHA dituang ke dalam cawan petri steril masing-masing 15 mL secara aseptik.

c. *Trython Soy Broth* (TSB)

Pembuatan media dalam uji mikrodilusi dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,2 gram TSB. Kemudian TSB dicampurkan dengan 10 mL akuades steril ke dalam tabung erlenmeyer. Selanjutnya media diaduk dan dipanaskan hingga mendidih dan larut, Kemudian media TSB disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah selesai, media TSB dituang pada cawan petri steril masing-masing 5 mL secara aseptik.

### 3.7.2 Penyiapan dan sterilisasi alat dan bahan

Semua alat dan bahan yang dibutuhkan selama proses persiapan hingga pengujian antibakteri disiapkan. Kemudian alat dan bahan dibungkus dengan kertas untuk selanjutnya disterilisasi. Sterilisasi dilakukan dengan memasukkan alat dan bahan yang telah disiapkan kedalam autoklaf yang telah diatur pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Alat yang tidak tahan pemanasan uap dapat disterilisasi menggunakan oven, alkohol atau pemijaran.



### 3.7.3 Pembuatan biakan murni

Bakteri uji *B. cereus* diremajakan dengan menggoreskan bakteri menggunakan jarum ose pada media NA yang dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

### 3.7.4 Peremajaan bakteri uji

Bakteri *B. cereus* yang tumbuh dibiakan dengan mengambil koloni bakteri menggunakan jarum ose pada media agar miring dalam kondisi aseptis kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

### 3.7.5 Pembuatan suspensi *Bacillus cereus* (inokulum)

Pembuatan suspensi *B. cereus* dilakukan dengan cara mengambil stok penyimpanan koloni *B. cereus* pada media NA sebanyak 4-5 koloni dengan menggunakan jarum ose yang dimasukkan ke dalam 5 mL NaCl 0,9% lalu divortex hingga homogen. Kekeruhan dari suspensi bakteri tersebut disesuaikan dengan kekeruhan bakteri  $3 \times 10^8$  CFU/mL (suspensi McFarland 0,5). Semua proses dilakukan secara aseptis

### 3.7.6 Pembuatan kontrol positif dan negatif

Kontrol negatif yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri adalah campuran pelarut (akuades steril, 2% tween 80 dan DMSO 10%). Sedangkan kontrol positif menggunakan gentamisin dengan kadar 40.000 µg/mL. pada metode difusi gentamisin dibuat pada konsentrasi 0,05 mg/mL sedangkan pada metode mikrodilusi, gentamisin diencerkan dan dibuat larutan dengan seri konsentrasi 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,50 dan 0,25 µg/mL

### 3.7.7 Pembuatan larutan uji

Ekstrak uji pada uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dengan menimbang 500 mg ekstrak dilarutkan dalam 1 mL pelarut sehingga diperoleh konsentrasi 500 mg/mL, kemudian dibuat seri konsentrasi 500; 250; 100; 500 mg/mL. Sedangkan Ekstrak uji dalam metode mikrodilusi dibuat dengan melarutkan 25 mg ekstrak dari daun *H. macrophyllus* dengan 1 mL pelarut

akuades steril sehingga diperoleh larutan induk 25.000  $\mu\text{g/mL}$ , kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex*. Dibuat konsentrasi dalam penentuan aktivitas antibakteri dengan seri konsentrasi 500,0; 250,0; 125,0; 62,50; 31,25 dan 15,63  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.7.8 Penentuan aktivitas antibakteri

Kegiatan ini dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak daun *H. macrophyllus* yang dilakukan dengan metode difusi sumuran dan metode mikrodilusi.

#### a. Metode difusi sumuran

Uji daya hambat yang dilakukan adalah dengan metode difusi sumuran. Permukaan media MHA diinokulasi dengan mengambil okulum bakteri dari suspensi bakteri yang telah disiapkan. Kemudian membuat lubang dengan diameter 10 mm secara aseptik dengan *cork borer steril*. Ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* ditambahkan ke dalam lubang pada berbagai konsentrasi yang diinginkan. Kontrol positif dan kontrol negatif sebesar 50  $\mu\text{l}$  dimasukkan ke dalam sumuran. Kemudian cawan agar dibiarkan 10 menit, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menggunakan inkubator. Ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri akan berdifusi dalam media agar dan menghambat pertumbuhan strain bakteri yang diuji.

Pengukuran diameter zona hambat dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong. Zona hambat diukur dengan cara mengukur diameter zona bening dikurangi diameter lubang sumuran (Ulyah dkk., 2015). Pengukuran dilakukan sebanyak 4 kali dan diambil rata-rata. Pengambilan data dilakukan sebanyak 4 replikasi pada masing-masing konsentrasi uji dikurangi oleh diameter dari sumur. Sehingga akan dihasilkan diameter dari zona hambatan.

### b. Metode mikrodilusi cair

Metode mikrodilusi cair dilakukan dengan menyiapkan beberapa peralatan yang sudah steril, suspensi bakteri, larutan uji dan larutan kontrol. Preparasi uji mikrodilusi dilakukan dengan memasukkan Media TSB ke dalam sumur *microplate* 96 wells sebanyak 50  $\mu\text{L}$ , kemudian ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri uji dan 100  $\mu\text{L}$  ekstrak dengan seri konsentrasi 500,0 ; 250,0; 125,0; 62,50; 31,25 dan 15,63  $\mu\text{g/mL}$ .

Preparasi kontrol dilakukan dengan memasukkan kontrol ekstrak, kontrol positif, kontrol negatif, kontrol media, dan kontrol gentamisin pada *microplate* 96 wells. Kontrol ekstrak dibuat dengan memasukkan 100  $\mu\text{L}$  ekstrak, 50  $\mu\text{L}$  media dan 50  $\mu\text{L}$  air. Kontrol negatif dibuat dengan memasukkan 50  $\mu\text{L}$  bakteri uji pada 50  $\mu\text{L}$  media dan 100  $\mu\text{L}$  NaCl 0,9%. Kontrol positif dibuat dengan memasukkan larutan gentamisin konsentrasi 50  $\mu\text{L}$ , bakteri uji sebanyak 50  $\mu\text{L}$ , media TSB 50  $\mu\text{L}$  dan 50  $\mu\text{L}$  NaCl 0,9%. Kontrol media dibuat dengan memasukkan sebanyak 50  $\mu\text{L}$  media TSB, 100 $\mu\text{L}$  akuades dan NaCl 0,9% 50  $\mu\text{L}$ . Desain *microplate* 96 wells ditunjukkan oleh gambar 3.3. Setelah dilakukan tahapan preparasi seperti desain mikroplate, selanjutnya pengamatan dilakukan setelah diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Untuk mengukur kekeruhan dihitung menggunakan instrument *microplatereader* dimana pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 595 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Gambar 3.3 Desain *Microplate* 96 wells 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Gambar 3.4 Desain *Microplate 96 wells 2*

keterangan :

- = Media TSB (50  $\mu$ L) + Ekstrak Uji (100  $\mu$ L) + *B. cereus* (50  $\mu$ L)
- = Kontrol Ekstrak yaitu Media TSB (50  $\mu$ L) + Ekstrak Uji (100  $\mu$ L) + NaCl 0,9% (50  $\mu$ L)
- = Kontrol Positif yaitu Media TSB (50  $\mu$ L) + Gentamisin (100  $\mu$ L) + *B. cereus* (50  $\mu$ L)
- = Kontrol Negatif yaitu Media TSB (50  $\mu$ L) + *B. cereus* (50  $\mu$ L) + Akuades (100  $\mu$ L)
- = Kontrol Gentamisin yaitu Media TSB (50  $\mu$ L) + Gentamisin (100  $\mu$ L) + NaCl 0,9% (50  $\mu$ L)
- = Kontrol Media yaitu Media TSB (50  $\mu$ L) + Akuades (100  $\mu$ L) + NaCl 0,9% (50  $\mu$ L)

### 3.8 Analisis Data

Data hasil diameter zona hambat dengan metode difusi sumuran diuji homogenitas dan normalitas terlebih dahulu. Bila data yang dihasilkan homogen dan terdistribusi normal maka dilanjutkan analisis menggunakan uji *One Way ANOVA*. *One way ANOVA* digunakan untuk melihat adanya perbedaan yang bermakna pada kelompok, kemudian dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui kelompok mana saja yang mempunyai perbedaan bermakna (Sudjana, 2000). Hasil uji *One Way ANOVA* dan LSD dikatakan signifikan jika  $p < 0,05$  dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ).  $KH_{50}$  dapat dihitung dengan persamaan 3.1.

## Persamaan 3.1 Penghambatan (%) pertumbuhan bakteri

$$\% \text{ penghambatan pertumbuhan bakteri} = 1 - \frac{(\text{Abs R} - \text{Abs S}) \times 100\%}{(\text{Abs P} - \text{Abs Q})} \quad \dots(3.1)$$

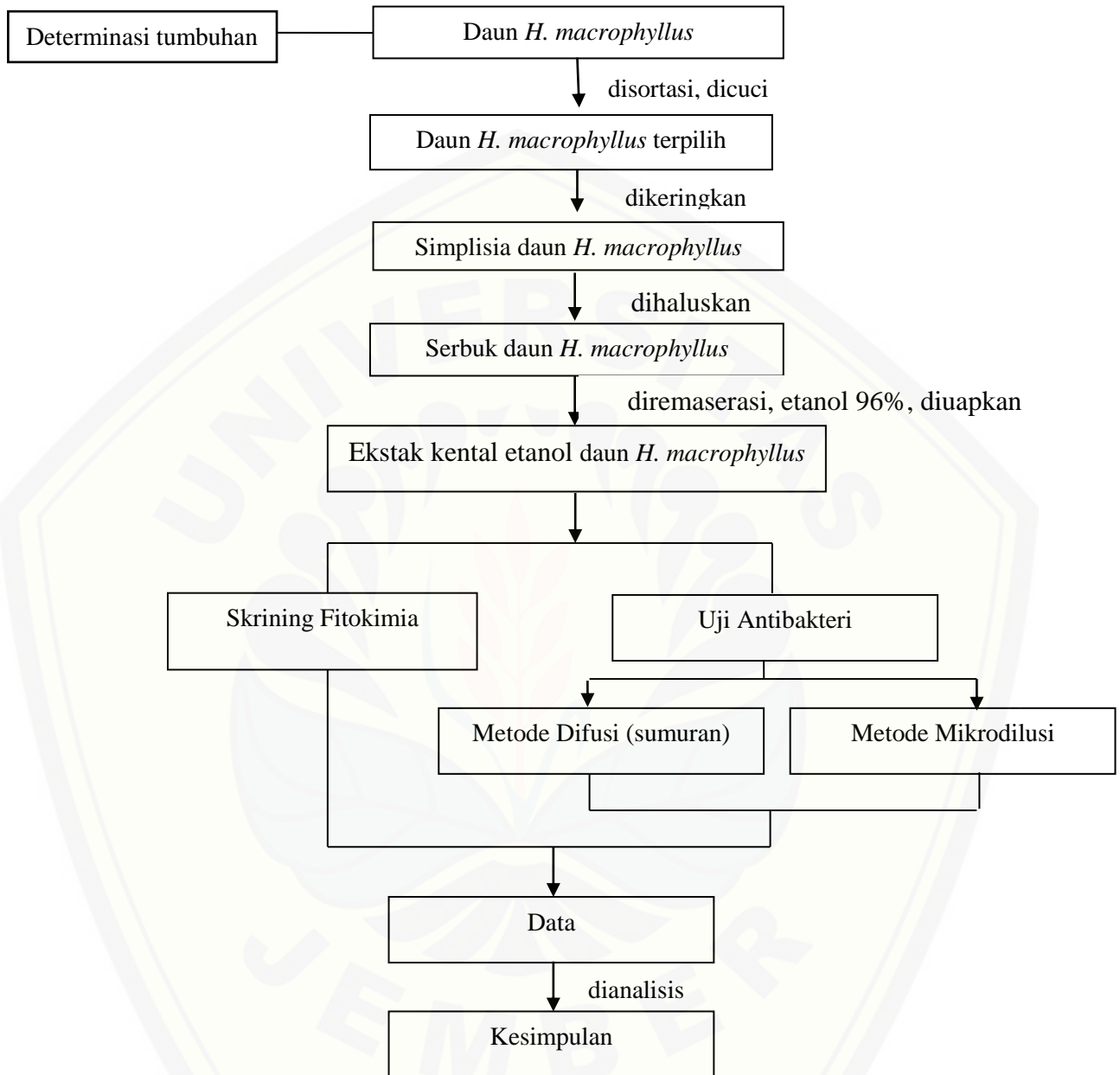
(dimodifikasi dari Quave dkk., 2008 dalam Ardani dkk., 2010)

Keterangan:

Abs	= Absorbansi
P	= Kontrol negatif (media TSB + <i>B. cereus</i> )
Q	= Kontrol media (media TSB)
R	= Uji (media TSB+ <i>B. cereus</i> + ekstrak larutan uji/ gentamisin)
S	= Kontrol ekstrak (media TSB + larutan uji/gentamisin)

Hasil dari perhitungan dibuat grafik antara konsentrasi ekstrak (absis) dengan persen penghambatan pertumbuhan bakteri (ordinat) dan dianalisis menggunakan metode analisis probit.

## 2.1 Skema Kerja



Gambar 3.5 Skema Kerja Penelitian

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut;

1. Ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, saponin, steroid, triterpenoid dan tanin.
2. Ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. cereus* yang dibuktikan dengan hasil dua metode pengujian yaitu difusi dan mikrodilusi. Adanya aktivitas antibakteri pada metode difusi ditandai dengan diameter zona bening di sekitar sumuran, sedangkan pada metode mikrodilusi ditandai dengan perhitungan persentase penghambatan bakteri.
3. Nilai rata-rata  $KH_{50}$  ekstrak etanol *H. Macrophyllus* terhadap pertumbuhan *B. cereus* sebesar 32,64  $\mu\text{g/mL}$ .

### 5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai :

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut dalam memisahkan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* agar dapat diketahui senyawa spesifik yang berpotensi sebagai antibakteri.
2. Penentuan kadar total dari senyawa untuk mengetahui besar efektivitas senyawa metabolit.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Al-Baqer, D. S. dan M. Badour. 2005. *Bacillus cereus*. King Saud University Collage of Pharmacy Department of Pharmaceutics Section of Microbiology.1-17.
- Alfina, Khurmatul WT. 2016. Uji Aktivitas Antihiperurisemia Ekstrak Metanol Kulit Batang Juwet (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) pada Mencit Jantan Galur Balb-C yang Diinduksi Kalium Oksona. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Ardani, M., S. U. T. Pratiwi, dan T. Hertiani. 2010. Efek Campuran Minyak Atsiri Daun Cengkeh dan Kulit Batang Kayu Manis sebagai Antiplak Gigi. *Majalah Farmasi Indonesia*. 21(3): 191 – 201.
- Arisman. 2009. *Keracunan Makanan*. Edisi I. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Balouiri, M., M. Sadiki, dan S. K. Ibsouda. 2016. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2):71–79.
- Besral. 2010. *Pengolahan dan Analisis Data-1 Menggunakan SPSS*. Depok:Departemen Biostatistika FKM UI.
- BNF.org. 2010. *British National Formulary*. Annals of Pharmacotherapy. 44(396–397).
- Bokaeian, M., M. Sheikh., Z. Shahi dan S. Saedi. 2014. Antimicrobial Activity of *Hibiscus Sabdariffal* Extract Against Human Pathogen. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 2(2):433-439.
- Bottone EJ. 2010. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinic Microbiol Ed 23* (2): 382-398.
- Brooks GF., Butel JS dan Morse SA. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan Mudihardi E, Kuntaman, Wasito EB. Jakarta: Salemba Medika, 317-27.



- Cos, P., A. J. Vlietinck, D. Vanden Berghe, dan L. Maes. 2006. Anti-infective Potential of Natural Products: How to Develop a Stronger in Vitro “Proof-of-Concept”. *Journal of Ethnopharmacology*. 106(3):290–302.
- Cowan, M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4):564–582.
- Departemen Kesehatan RI. 1980. *Materia Medika Indonesia Jilid IV*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Departemen Kesehatan RI. 1989. *Materia Medika Indonesia Jilid V*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan.
- Departemen Kesehatan RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Departemen kesehatan. 2008. *Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2007*. Jakarta: Departemen kesehatan RI.
- Devendra N.B, N. Srinivas, P. Talluri, P. Latha. 2011. Antimicrobial Activity of *Moringa Oleifera Lam.*, Leaf Extract, Againsts Selected Bacterial and Fungal Strains. *Interbational Journal of Pharma and Bio Science* penyunting Rushikonda, Visakhapatnam, A.P, India: *Departemen of Biotechnology, GITAM Institute of Science, GITAM University*.2(3):13-18.
- Dewi, I., Astuti, K. dan Warditiani, N.K. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*). *Skripsi*. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana. Bali.
- Dorland, W.A Newman. 2009. *Kamus Kedokteran Dorland Edisi 29*. Jakarta: Buku kedokteran EGC.

Dorr, Laurence J. 2012. *Hibiscus macrophyllus*. [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=502997#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=502997#null) [Diakses pada tanggal 5 Februari 2017].

Frankland dan Frankland. 1887. *Bacillus cereus*. [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=959821#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=959821#null). [Diakses pada tanggal 5 Februari 2017].

Filho, Limha, J. V. dan R. de A. Cordeiro. 2014. In Vitro and in Vivo Antibacterial and Antifungal Screening of Natural Plant Products: Prospective Standardization of Basic Methods. *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology*. 311–319.

Hadi, S. 1999. *Statistika dalam Basica*. Yogyakarta: ANDI OFFSET.

Harbone JM dan Baxter H.1993. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Taylor and Francis Ltd. London. Washington DC, USA.755.

Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid I dan II*. Terjemahan Badan Libang Kehutanan. Cetakan I. Jakarta: Koperasi karyawan Departemen Kehutanan.

Indarto. 2015. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Golongan Senyawa Organik Dari Kulit dan Kayu Batang Tumbuhan *Artocarpus dadah* Miq. Lampung: FTK IAIN Raden Itan Lampung.

Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi: Menguak Dunia Mikroorganisme Jilid 2*. Bandung: CV. Yrama Widya.

Ivanova, E. P., R. J, dan Crawford. 2015. *Antibacterial Surfaces*. New York Dordrecht London: Springer International Publishing Switzerland.

- Karou, D., M. H. Dicko, J. Simpo, dan A. S. Traore. 2005. Antioxidant and Antibacterial Activities of Polyphenols from Plant of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*. 4(8):823-828.
- Katzung, B.G. 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kementerian Kesehatan RI. 2016. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2015*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Marliana, Suryanti dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule Jacq. Swartz.*) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*. 3(1):26-31.
- Mounnissamy VM, Kavimani S, Gunasegaran R. 2002. Antibacterial Activity of Gossypetin Isolated from *Hibiscus sabdariffa*. *The antiseptic*. 99:81-82
- Nafisah, M., S. Tukiran, Suyatno dan N. Hidayati. 2014. Uji Skrining Fitokimia Pada Ekstrak Heksan, Kloroform dan Metanol dari Tanaman Patikan Kebo (*Euphorbiae hirtae*). *Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya*. 279-286.
- Padmasari, P D., Astuti, K W., Warditiani, N K. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum Roxb.*). *Jurnal Farmasi Udayana*. 2(4):1-4.
- Panda, Sujogya Kumar. 2012. Screening Methods in the Study of Antimicrobial Properties of Medicinal Plants. *International Journal of Biotechnology and Research (IJBTR)*. 2:1-35.
- Pelczar, M.J dan Chan, E. C. S. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Terjemahan Ratna Siri Hadjoetomo, dkk. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Prasetyo dan E. Inorih. 2013. *Pengolahan Budidaya Tanaman Obat-obatan (Bahan Simplisia)*. Bengkulu: Badan Penerbitan Fakultas Pertanian UNIB.

- Pratiwi, Sylvia T. 2009. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Purwoko, T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Puspariani, Yustina Sakundita. 2007. Isolasi dan Identifikasi Saponin pada Kecambah Kedelai. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta
- Qaromah, E. R. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm Minyak Atsiri Rimpang Lempuyangan Wangi (*Zingiber aromaticum Val*) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Qomah, Isti., S. Hariani dan S. Murdiah. 2015. Identifikasi Tumbuhan Berbiji (Spermatophyta) di Lingkungan Kampus Universitas Jember dan Pemanfaatannya sebagai Booklet. *Digital respository Universitas Jember*. 8:86–87.
- Ramproshad, S., T. Afroz, B. Mondal, A. Haque, S. Ara, R. Khan, dan S. Ahmed. 2012. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Leaves of Medicinal Plant *Hibiscus tiliaceus* L. *Pharmacologyonline*. 3:82–87.
- Ristiati, N. P. 2000. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Jakarta: Departemen Pendidikan Nasional.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J. and Quinn M., E. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Lexi-Comp: American Pharmaceutical. Association, Inc. 418.
- Saifudin, Aziz. 2014. *Senyawa Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta: Deepublish.

- Salem, M. Z. M., J. Olivares-Pérez, dan A. Z. M. S. 3. 2014. Studies on Biological Activities and Phytochemicals Composition of *Hibiscus* species- a review. *Life Science Journal*. 63(10):1-7.
- Santjaka, A. 2011. *Statistik Untuk Penelitian Kesehatan*. Yogyakarta: Nuhu Medika.
- Santos, A.F., B.Q. Guevera, A.M. Mascardo, dan C.Q. Estrada. 1978. Phytochemical, Microbiological and Pharmacological, Screening of Medical Plants. Manila : *Research Center University of Santo Thomas*.
- Sastrapradja, Setijati., K. Kuswata, S. Usep, Roemantyo, W. Hari, S. Soekristijono. 1980. *Kayu Indonesia*. Jakarta: LBN - LIPI bekerjasama dengan Balai Pustaka. 14:14-15.
- Sekar, M., H. Hashim, F. Fadzil, S. Sukaini, N. Zukhi, M. Nadzri, dan M. Abdullah. 2015. Antibacterial Activity of the Methanolic Extract of *Hibiscus Sabdariffa* Leaves and Fruits. *British Microbiology Research Journal*. 10(5):1-6.
- Septyaningsih, D. 2010. Isolasi Dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). *Skripsi*. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Setyowati, W. A. E., S. R. D. Ariani, Ashadi, B. Mulyani dan C. P. Rahmawati. 2014. Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Varietas Petruk. *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI*. 21 Juni 2014. Universitas Sebelas Maret Surakarta: 271-280.
- Soleha, tri umiana. 2015. Uji Kepekaan terhadap Antibiotik. *Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung*. 3-7.
- Svhela, G. 1990. *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro*. Edisi kelima. Jakarta: PT Kalman Media Pusaka

- Sweetman, S.C., 2009. *Martindale : The Complete Drug Reference 36<sup>th</sup> edition*, Pharmaceutical Press. London: Pharmaceutical Press.
- Tajkarimi, M. 2007. *Bacillus cereus*. [http://www.cdfa.gov/hfs/Animal\\_Health/PHR250200725007BeerMh\\_2.pdf](http://www.cdfa.gov/hfs/Animal_Health/PHR250200725007BeerMh_2.pdf). [Diakses pada 5 Februari 2017]
- Tamboto, J., H. Homenta., dan Juliatri. 2017. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Kembang Sepatu (*Hibiscus Rosa-Sinensis* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Porphyromonas Gingivalis* secara *in Vitro*. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*. 6(1):31-36.
- The Commission Of The European Communities. 2002. Commission Directive 2002/70/Ec Of 26 July 2002: Establishing Requirements for the Determination of Levels of Dioxins and Dioxin-Like Pcb's in Feedingstuffs. *Official Journal of the European Communities*. 15–21
- Tiwari, P., B. Kumar, M. Kaur, G. Kaur, dan H. Kaur. 2011. Phytochemical Screening and Extraction: a Review. *Internationale Phamaceutica Scientia*. 1(1):98–106.
- Todar, K. 2012. *Bacillus cereus* Food Poisoning. [http:// www.textbook of bacteriology.net/staph.html](http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html). [Diakses 5 Februari 2017]
- Uddin, B., T. Hossan, S. Paul, T. Ahmed, T. Nahar, dan S. Ahmed. 2010. Antibacterial Activity of the Ethanol Extracts of *Hibiscus Rosa-Sinensis* Leaves and Flowers Against Clinical Isolates of Bacteria. *Bangladesh J. Life Sci*. 22(2):65–73.
- Wagner, H. dan Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy Research: Approaching a New Generation of Phytopharmaceuticals. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 16: 97–110.
- WHO. 2016. Infectious Diseases. [http://www.who.int/topics/infectious\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/) [Diakses pada 05 Februari 2016].

LAMPIRAN

Lampiran 4.1 Hasil Determinasi Tumbuhan *Hibiscus macrophyllus*



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**  
**(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)**  
**BALAI KONSERVASI TUMBUHAN**  
**KEBUN RAYA PURWODADI**  
Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163  
Telp. (+62 343) 615033, Faks. (+62 341) 426046  
website : <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>



**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TUMBUHAN**

No: 0263/IPH.06/HM/V/2017

Kepala Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi LIPI dengan ini menerangkan bahwa material tumbuhan yang dibawa oleh:

Nama : Riza Putri Agustina  
NIM : 132210101033  
Instansi : Mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember.  
Tanggal material diterima : 2 Juni 2017

Telah diidentifikasi/determinasi berdasarkan koleksi herbarium dan koleksi kebun serta referensi ilmiah, dengan hasil sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Division : Magnoliophyta  
Class : Magnoliopsida  
Subclass : Dilleniidae  
Ordo : Malvales  
Family : Malvaceae  
Genus : Hibiscus  
Species : *Hibiscus macrophyllus* Roxb. Ex Hornem

Referensi:

1. Backer CA & Bakhuizen van den Brink RC. 1963. Flora of Java Vol. I. NVP Noordhoff, Groningen, The Netherlands. Hal. 430
2. Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, USA. Hal. XIV

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 10 Juni 2017

An. Kepala

Kepala Seksi Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan



Deden Magrana, S.Hut., M.Si.

**Lampiran 4.2 Data Rendemen Ekstrak Etanol Daun *H. macrophyllus***

Perhitungan % Rendemen

Bobot serbuk kering *H. macrophyllus* = 250 gram

Volume etanol yang digunakan = 2000 mL

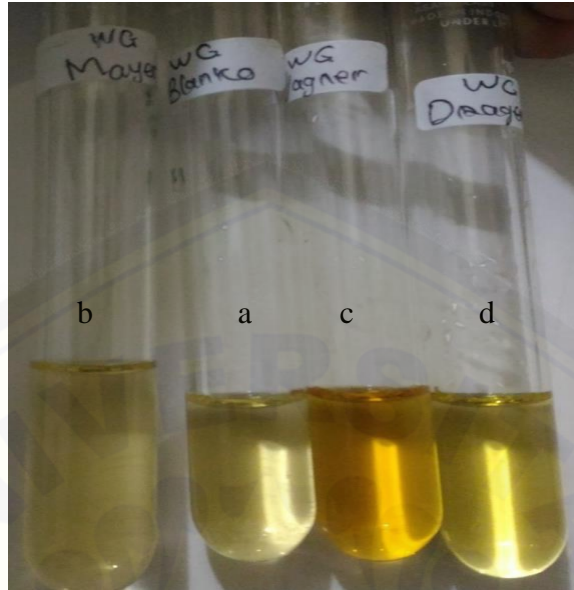
Ekstrak kental = 30,100gram

Rendemen yang diperoleh =  $\frac{30,100}{250} \times 100\%$

= 12,040%



**Lampiran 4.3 Gambar Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun *H. macrophyllus***



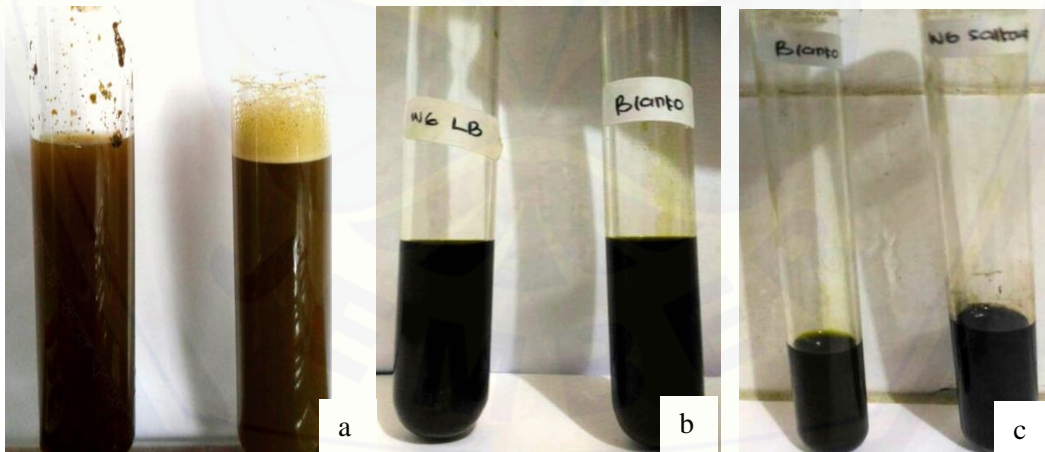
Gambar skrining Fitokimia golongan senyawa alkaloid

Keterangan : (a) Blanko;

(b) Penambahan pereaksi Mayer tidak terbentuk endapan

(c) Penambahan pereaksi Wagner tidak terbentuk endapan

(d) Penambahan pereaksi Dragendorff tidak terbentuk endapan

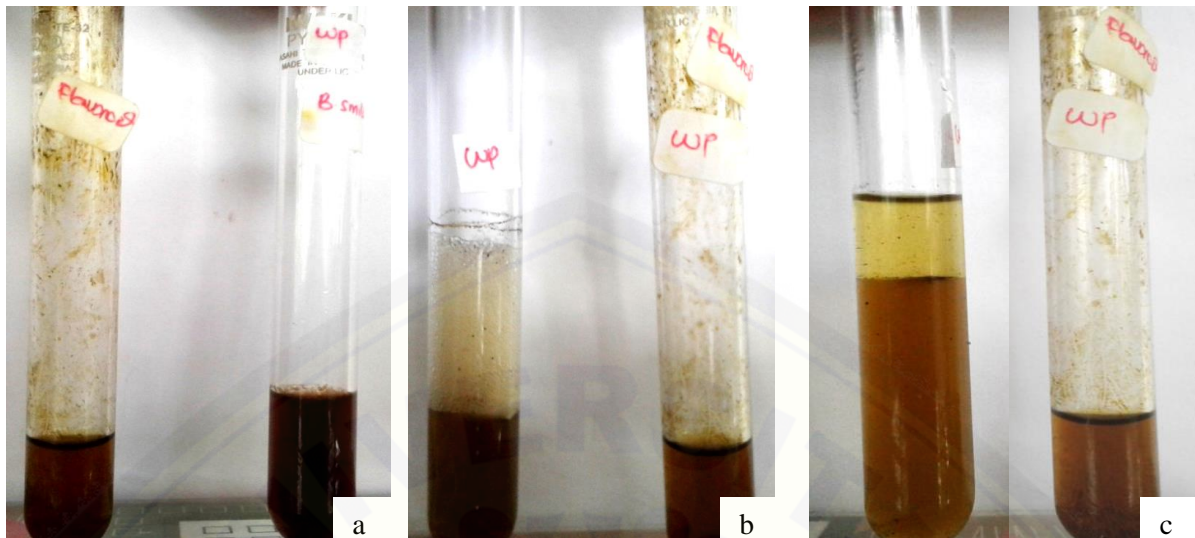


Gambar skrining Fitokimia golongan senyawa Glikosida Saponin, Triterpenoid dan Steroid

Keterangan : (a) Blanko-Uji Saponin menunjukkan busa yang stabil

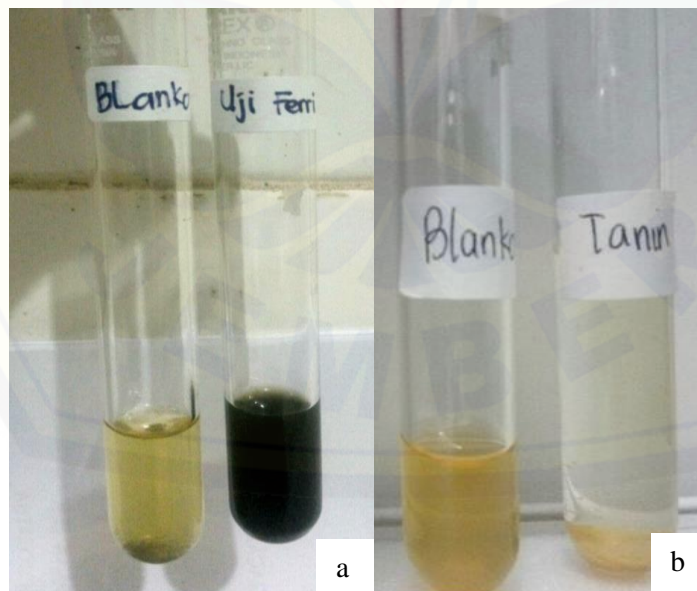
(b) Uji Liebermann Buchard- Blanko menunjukkan tidak adanya perubahan warna

(c) Blanko-Uji Salkowski menunjukkan tidak adanya perubahan warna



Gambar Skrining Fitokimia Golongan Senyawa Flavonoid

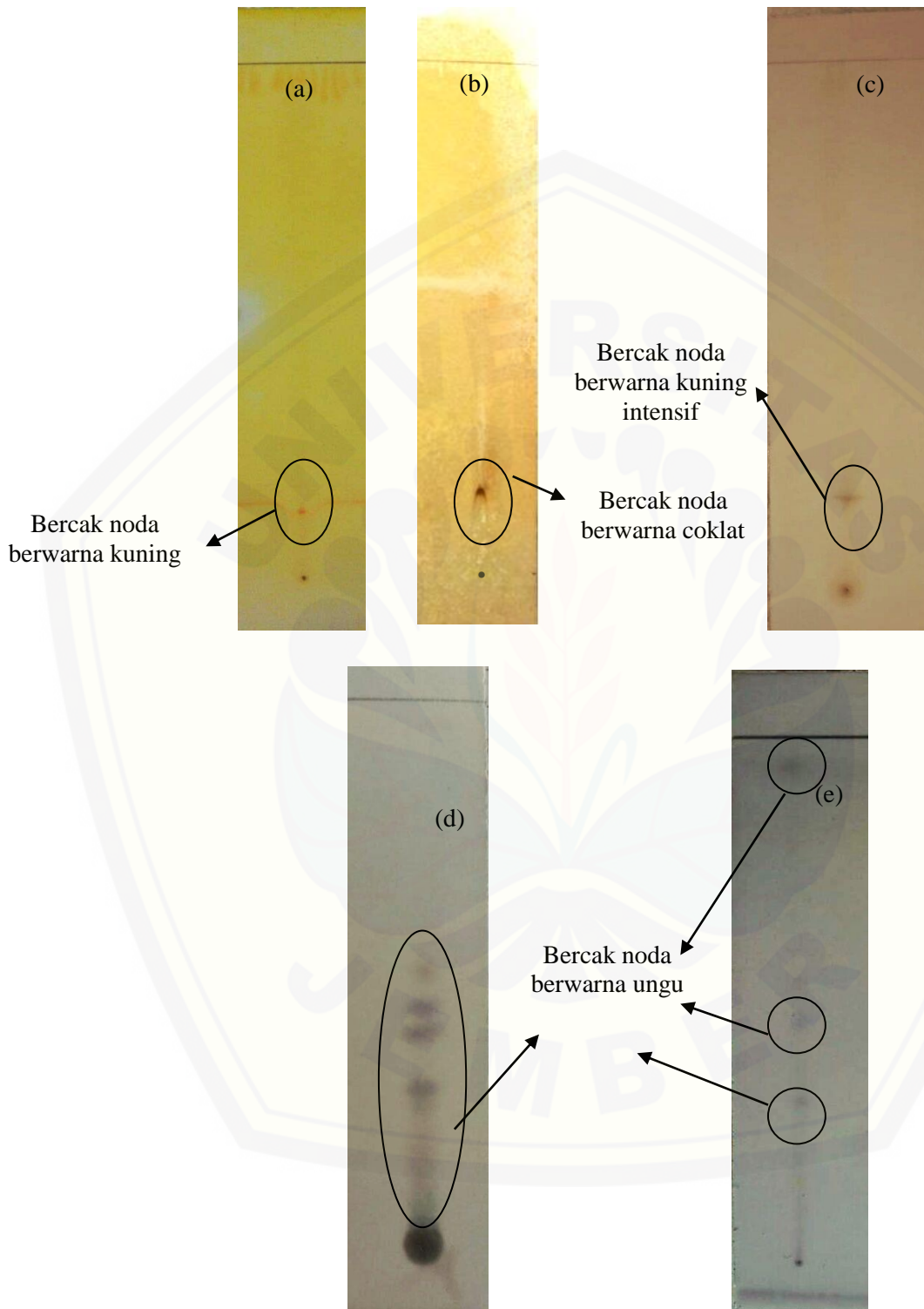
- Keterangan :
- (a) Blangko-Uji Bate Smith Metcalf menunjukkan adanya perubahan menjadi warna merah
  - (b) Uji Wilstater sebelum penambahan butanol-Blangko; menunjukkan adanya gelembung
  - (c) Uji Wilstater setelah penambahan butanol-Blangko; menunjukkan tidak adanya perubahan warna



Gambar Skrining Senyawa Golongan Polifenol Dan Tanin

- Keterangan :
- (a) Blangko-Uji Ferriklorida menunjukkan perubahan warna menjadi hijau kehitaman
  - (b) Uji Gelatin-Blangko menunjukkan adanya endapan

**Hasil Skrining Fitokimia dengan Penegasan KLT**



(a) KLT-Alkaloid; (b) KLT- Polifenol; (c) KLT-Flavonoid; (d) KLT-Terpenoid atau Steroid Bebas dan (e) KLT-Sapogenin Steroid atau Triterpenoid.

#### Lampiran 4.4 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun *Hibiscus macrophyllus*

##### 1. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun *H. macrophyllus* pada Metode Difusi

- Penimbangan Ekstrak = 500 mg/1 mL  
= 500 mg/mL
- Pengenceran Ekstrak  
Konsentrasi 500 mg/mL  
500 mg add 1 mL = 500 mg/mL  
Konsentrasi 250 mg/mL  
500 mg/mL x Volume = 250 mg/mL x 1 mL  
Volume yang diperlukan = 0,5 mL (add 0,6 mL akuades steril)  
Konsentrasi 100 mg/mL  
250 mg/mL x Volume = 100 mg/mL x 1 mL  
Volume yang diperlukan = 0,4 mL (add 0,6 mL akuades steril)  
Konsentrasi 50 mg/mL  
100 mg/mL x Volume = 50 mg/mL x 1 mL  
Volume yang diperlukan = 0,5 mL (add 0,5 mL akuades steril)

##### 2. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun *H. macrophyllus* pada Metode Mikrodilusi

- Penimbangan Ekstrak = 25,0 mg dalam 1mL  
= 25.000 µg/mL
- Pengenceran Ekstrak  
Konsentrasi 1000 µg/mL  
25.000 µg/mL x Volume = 1000 µg/mL x 3000 µL  
= 120 µL (add 2880 µL akuades steril)  
Konsentrasi 500 µg/mL  
1000 µg/mL x Volume = 500 µg/mL x 2000 µL  
= 1000 µL (add 1000 µL akuades steril)

Konsentrasi 250 µg/mL

$$\begin{aligned} 500 \mu\text{g/mL} \times \text{Volume} &= 250 \mu\text{g/mL} \times 2000 \mu\text{L} \\ &= 1000 \mu\text{L} \text{ (add 1000 } \mu\text{L akuades steril)} \end{aligned}$$

Konsentrasi 125 µg/mL

$$\begin{aligned} 250 \mu\text{g/mL} \times \text{Volume} &= 125 \mu\text{g/mL} \times 2000 \mu\text{L} \\ &= 1000 \mu\text{L} \text{ (add 1000 } \mu\text{L akuades steril)} \end{aligned}$$

Konsentrasi 62,50 µg/mL

$$\begin{aligned} 125 \mu\text{g/mL} \times \text{Volume} &= 62,50 \mu\text{g/mL} \times 2000 \mu\text{L} \\ &= 1000 \mu\text{L} \text{ (add 1000 } \mu\text{L akuades steril)} \end{aligned}$$

Konsentrasi 31,25 µg/mL

$$\begin{aligned} 62,50 \mu\text{g/mL} \times \text{Volume} &= 31,25 \mu\text{g/mL} \times 2000 \mu\text{L} \\ &= 1000 \mu\text{L} \text{ (add 1000 } \mu\text{L akuades steril)} \end{aligned}$$

**Lampiran 4. 5 Perhitungan Konsentrasi Gentamisin**

## 1. Perhitungan Konsentrasi Gentamisin pada Metode Difusi

400 µg/mL

$$\begin{aligned} 40.000 \text{ µg/mL} \times \text{Volume} &= 400 \text{ µg/mL} \times 1000 \text{ µL} \\ &= 10 \text{ µL (add 990 µL akudaes steril)} \end{aligned}$$

50 µg/mL

$$\begin{aligned} 400 \text{ µg/mL} \times \text{Volume} &= 50 \text{ µg/mL} \times 1000 \text{ µL} \\ &= 125 \text{ µL (add 875 µL akudaes steril)} \end{aligned}$$

## 2. Perhitungan Konsentrasi Gentamisin pada Metode Mikrodilusi

200 µg/mL

$$\begin{aligned} 40.000 \text{ µg/mL} \times \text{Volume} &= 200 \text{ µg/mL} \times 3000 \text{ µL} \\ &= 15 \text{ µL (add 2885 µL akudaes steril)} \end{aligned}$$

16 µg/mL

$$\begin{aligned} 200 \text{ µg/mL} \times \text{Volume} &= 16 \text{ µg/mL} \times 1000 \text{ mL} \\ &= 80 \text{ µL (add 920 µL akuades steril)} \end{aligned}$$

8 µg/mL

$$\begin{aligned} 16 \text{ µg/mL} \times \text{Volume} &= 8 \text{ µg/mL} \times 1000 \text{ mL} \\ &= 500 \text{ µg/mL (add 5 mL akuades steril)} \end{aligned}$$

4 µg/mL

$$\begin{aligned} 8 \text{ µg/mL} \times \text{Volume} &= 4 \text{ µg/mL} \times 1000 \text{ mL} \\ &= 500 \text{ µg/mL (add 500 µg/mL akuades steril)} \end{aligned}$$

2 µg/mL

$$\begin{aligned} 4 \text{ µg/mL} \times \text{Volume} &= 2 \text{ µg/mL} \times 1000 \text{ mL} \\ &= 500 \text{ µg/mL (add 500 µg/mL akuades steril)} \end{aligned}$$

1 µg/mL

$$\begin{aligned} 2 \text{ µg/mL} \times \text{Volume} &= 200 \text{ µg/mL} \times 1000 \text{ mL} \\ &= 500 \text{ µg/mL (add 500 µg/mL akuades steril)} \end{aligned}$$

5  $\mu\text{g/mL}$

1  $\mu\text{g/mL}$  x Volume = 5  $\mu\text{g/mL}$  x 1000 mL

= 500  $\mu\text{g/mL}$  (add 500  $\mu\text{g/mL}$  akuades steril)



**Lampiran 4.6 Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstak Etanol Daun  
*Hibiscus macrophyllus* Metode Difusi Sumuran**

Kelompok	Konsentrasi (mg/mL)	Diameter Zona Hambat (mm)			Rata-rata	SD	CV
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3			
Ekstrak Uji	500	8,50	8,58	8,53	8,54	0,04	0,47
	250	5,95	5,80	5,75	5,83	0,10	1,72
	100	3,75	3,83	3,85	3,81	0,05	1,31
	50	2,75	2,38	2,80	2,64	0,23	8,71
Kontrol Negatif	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kontrol Positif	0,05	13,58	13,40	13,63	13,54	0,12	0,89



**Lampiran 4.7 Hasil Analisis Statistika Aktivitas Antibakteri Ekstak Etanol Daun *Hibiscus macrophyllus* dengan Metode Difusi**

**Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas**

**Tests of Normality**

Value	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Penghambatan 500	.307	3	.	.903	3	.395
250	.292	3	.	.923	3	.463
100	.314	3	.	.893	3	.363
50	.346	3	.	.838	3	.209

a. Lilliefors Significance Correction

**Test of Homogeneity of Variances**

Penghambatan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.263	3	8	.080

**Hasil Uji *One Way* ANOVA dan LSD**

**ANOVA**

Penghambatan	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	623027,583	3	207675,861	797,475	,000
Within Groups	2083,333	8	260,417		
Total	625110,917	11			

Keterangan :

Jika nilai sig > 0,05 maka berhenti dianalisis *One Way Anova*

Jika nilai < 0,05 maka dilanjutkan analisis LSD (*Least Significant Difference*)

Nilai sig < 0,05 maka dilanjutkan analisis LSD (*Least Significant Difference*)

**Post Hoc Tests****Multiple Comparisons**

penghambatan

LSD

(I) value	(J) value	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
500 mg/mL	250 mg/mL	281.66667*	13.17616	.000	251.2824	312.0509
	100 mg/mL	484.00000*	13.17616	.000	453.6157	514.3843
	50 mg/mL	600.66667*	13.17616	.000	570.2824	631.0509
250 mg/mL	500 mg/mL	-281.66667*	13.17616	.000	-312.0509	-251.2824
	100 mg/mL	202.33333*	13.17616	.000	171.9491	232.7176
	50 mg/mL	319.00000*	13.17616	.000	288.6157	349.3843
100 mg/mL	500 mg/mL	-484.00000*	13.17616	.000	-514.3843	-453.6157
	250 mg/mL	-202.33333*	13.17616	.000	-232.7176	-171.9491
	50 mg/mL	116.66667*	13.17616	.000	86.2824	147.0509
50 mg/mL	500 mg/mL	-600.66667*	13.17616	.000	-631.0509	-570.2824
	250 mg/mL	-319.00000*	13.17616	.000	-349.3843	-288.6157
	100 mg/mL	-116.66667*	13.17616	.000	-147.0509	-86.2824

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

#### Lampiran 4.8 Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Metode Mikrodilusi dalam Penentuan $KH_{50}$

##### Absorbansi Media dan *B. cereus*

Kelompok	Absorbansi			Rata-rata Absorbansi
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
Bakteri	0,778	0,778	0,788	0,781
Media	0,293	0,297	0,299	0,296

##### Absorbansi Ekstrak Etanol *H. macrophyllus*

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi Ekstrak Uji dengan Bakteri			Absorbansi Kontrol Ekstrak
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
500,0	2,036	2,045	2,042	2,022
250,0	1,809	1,849	1,840	1,754
125,0	1,760	1,784	1,799	1,608
62,50	1,429	1,444	1,445	1,209
31,25	1,303	1,314	1,325	1,072
15,13	1,245	1,248	1,281	1,000

##### Penghambatan Ekstrak Etanol *H. macrophyllus*

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Penghambatan (%)			Rata-rata Penghambatan (%)	SD	CV (%)
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3			
500,0	97,113	95,258	95,876	96,082	0,945	0,984
250,0	88,660	80,412	82,268	83,780	4,327	5,165
125,0	68,660	63,711	60,619	64,330	4,056	6,305
62,50	54,639	51,546	51,340	52,508	1,848	3,519
31,25	52,371	50,103	47,835	50,103	2,268	4,527
15,13	49,485	48,866	42,062	46,804	4,119	8,801

• Analisis Probit Ekstrak Etanol Daun *Hibiscus macrophyllus* Replikasi 1

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> 0.01	.200	.000	2.019	-.699	-5.045	.305
0.02	.355	.000	2.892	-.450	-4.371	.461
0.03	.511	.000	3.635	-.291	-3.944	.561
0.04	.673	.000	4.320	-.172	-3.624	.636
0.05	.841	.000	4.974	-.075	-3.363	.697
0.06	1.017	.001	5.609	.007	-3.141	.749
0.07	1.201	.001	6.234	.079	-2.946	.795
0.08	1.394	.002	6.854	.144	-2.772	.836
0.09	1.596	.002	7.474	.203	-2.614	.874
0.1	1.808	.003	8.095	.257	-2.469	.908
0.15	3.030	.014	11.298	.482	-1.868	1.053
0.2	4.569	.041	14.790	.660	-1.392	1.170
0.25	6.498	.103	18.719	.813	-.986	1.272
0.3	8.915	.238	23.252	.950	-.623	1.366
0.35	11.951	.513	28.613	1.077	-.290	1.457
0.4	15.782	1.053	35.141	1.198	.022	1.546
0.45	20.655	2.086	43.394	1.315	.319	1.637
0.5	26.917	4.014	54.376	1.430	.604	1.735
0.55	35.077	7.512	70.091	1.545	.876	1.846
0.6	45.907	13.562	94.970	1.662	1.132	1.978
0.65	60.626	23.239	139.728	1.783	1.366	2.145
0.7	81.272	37.120	231.780	1.910	1.570	2.365
0.75	111.506	55.299	445.310	2.047	1.743	2.649
0.8	158.582	78.781	1008.115	2.200	1.896	3.004
0.85	239.078	111.366	2792.248	2.379	2.047	3.446

0.9	400.742	163.752	10577.191	2.603	2.214	4.024
0.91	453.989	178.878	14660.356	2.657	2.253	4.166
0.92	519.884	196.615	20930.949	2.716	2.294	4.321
0.93	603.430	217.837	31007.116	2.781	2.338	4.491
0.94	712.705	243.889	48164.681	2.853	2.387	4.683
0.95	861.685	276.984	79719.276	2.935	2.442	4.902
0.96	1076.969	321.081	144355.069	3.032	2.507	5.159
0.97	1416.687	384.230	300157.344	3.151	2.585	5.477
0.98	2039.660	486.486	796416.440	3.310	2.687	5.901
0.99	3622.702	702.506	3724166.688	3.559	2.847	6.571

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

### Analisis Probit i Ekstrak Etanol Daun *Hibiscus macrophyllus* Replikasi 2

#### Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> 0.01	.103	.000	1.581	-.987	-7.207	.199
0.02	.201	.000	2.366	-.697	-6.291	.374
0.03	.307	.000	3.058	-.514	-5.710	.485
0.04	.421	.000	3.712	-.375	-5.273	.570
0.05	.546	.000	4.347	-.263	-4.918	.638
0.06	.680	.000	4.974	-.167	-4.616	.697
0.07	.825	.000	5.600	-.083	-4.352	.748
0.08	.981	.000	6.229	-.008	-4.115	.794
0.09	1.148	.000	6.863	.060	-3.900	.837
0.1	1.327	.000	7.507	.123	-3.702	.875
0.15	2.417	.001	10.912	.383	-2.883	1.038

0.2	3.891	.006	14.765	.590	-2.235	1.169
0.25	5.856	.021	19.245	.768	-1.681	1.284
0.3	8.453	.065	24.578	.927	-1.186	1.391
0.35	11.878	.185	31.099	1.075	-.732	1.493
0.4	16.402	.494	39.347	1.215	-.306	1.595
0.45	22.413	1.254	50.295	1.350	.098	1.702
0.5	30.476	3.047	65.910	1.484	.484	1.819
0.55	41.440	7.045	90.759	1.617	.848	1.958
0.6	56.628	15.130	137.081	1.753	1.180	2.137
0.65	78.198	28.994	241.375	1.893	1.462	2.383
0.7	109.877	48.593	518.856	2.041	1.687	2.715
0.75	158.603	73.532	1367.214	2.200	1.866	3.136
0.8	238.679	106.006	4424.601	2.378	2.025	3.646
0.85	384.342	152.725	18491.326	2.585	2.184	4.267
0.9	699.921	231.505	116769.206	2.845	2.365	5.067
0.91	808.959	254.929	182984.462	2.908	2.406	5.262
0.92	946.749	282.718	298459.793	2.976	2.451	5.475
0.93	1125.494	316.387	511745.188	3.051	2.500	5.709
0.94	1365.299	358.287	935719.417	3.135	2.554	5.971
0.95	1701.761	412.317	1864930.146	3.231	2.615	6.271
0.96	2204.445	485.550	4199735.588	3.343	2.686	6.623
0.97	3030.273	592.566	1.141E7	3.481	2.773	7.057
0.98	4625.633	770.361	4.322E7	3.665	2.887	7.636
0.99	9009.247	1160.345	3.538E8	3.955	3.065	8.549

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

Analisis Probit Ekstrak Etanol Daun *Hibiscus macrophyllus* Replikasi 3

## Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> 0.01	.255	.000	2.253	-.594	-4.288	.353
0.02	.457	.000	3.273	-.340	-3.657	.515
0.03	.663	.001	4.151	-.179	-3.257	.618
0.04	.876	.001	4.967	-.057	-2.957	.696
0.05	1.100	.002	5.750	.041	-2.712	.760
0.06	1.334	.003	6.516	.125	-2.505	.814
0.07	1.581	.005	7.273	.199	-2.323	.862
0.08	1.840	.007	8.028	.265	-2.160	.905
0.09	2.112	.010	8.785	.325	-2.012	.944
0.1	2.398	.013	9.546	.380	-1.876	.980
0.15	4.058	.049	13.515	.608	-1.314	1.131
0.2	6.164	.135	17.910	.790	-.870	1.253
0.25	8.823	.323	22.935	.946	-.491	1.361
0.3	12.175	.702	28.836	1.085	-.154	1.460
0.35	16.409	1.428	35.966	1.215	.155	1.556
0.4	21.781	2.768	44.890	1.338	.442	1.652
0.45	28.647	5.163	56.597	1.457	.713	1.753
0.5	37.514	9.288	72.984	1.574	.968	1.863
0.55	49.126	16.046	98.008	1.691	1.205	1.991
0.6	64.612	26.322	140.495	1.810	1.420	2.148
0.65	85.764	40.548	220.723	1.933	1.608	2.344
0.7	115.591	58.767	386.529	2.063	1.769	2.587
0.75	159.516	81.648	760.125	2.203	1.912	2.881
0.8	228.331	111.640	1702.534	2.359	2.048	3.231
0.85	346.836	154.619	4531.523	2.540	2.189	3.656

0.9	586.905	225.828	16018.820	2.769	2.354	4.205
0.91	666.413	246.694	21799.047	2.824	2.392	4.338
0.92	765.041	271.286	30494.850	2.884	2.433	4.484
0.93	890.417	300.862	44153.651	2.950	2.478	4.645
0.94	1054.879	337.365	66826.230	3.023	2.528	4.825
0.95	1279.837	383.995	107327.469	3.107	2.584	5.031
0.96	1606.156	446.503	187505.531	3.206	2.650	5.273
0.97	2123.460	536.638	372873.630	3.327	2.730	5.572
0.98	3077.751	683.831	931788.030	3.488	2.835	5.969
0.99	5524.436	998.533	3960317.283	3.742	2.999	6.598

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.



**Penghambatan Gentamisin terhadap *Bacillus cereus***Absorbansi Ekstrak Etanol *H. macrophyllus*

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi Ekstrak Uji dengan Bakteri			Absorbansi Kontrol Ekstrak
	R1	R2	R3	
8,0	0,748	0,737	0,754	0,749
4,0	0,840	0,840	0,845	0,813
2,0	0,865	0,868	0,865	0,756
1,0	0,975	0,974	0,974	0,725
0.50	1,069	1,066	1,065	0,716
0.25	1,131	1,131	1,129	0,711

Penghambatan Gentamisin terhadap *B. cereus*

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Penghambatan (%)			Rata-rata Persentase Penghambatan (%)	SD
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3		
8,0	100,206	102,474	98,969	100,550	1.778
4,0	94,433	94,433	93,402	94,089	0.595
2,0	77,526	76,907	77,526	77,320	0.357
1,0	48,454	48,660	48,660	48,591	0.119
0,50	27,216	27,835	28,041	27,698	0.429
0,25	13,196	13,196	13,608	13,333	0.238

### Hasil Analisis Probit Gentamisin Terhadap *Bacillus cereus* Replikasi 1

#### Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>a</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0.01	.158	.055	.287	-.801	-1.258	-.542
0.02	.199	.076	.344	-.701	-1.119	-.464
0.03	.230	.093	.386	-.638	-1.031	-.414
0.04	.257	.108	.421	-.590	-.965	-.376
0.05	.281	.123	.452	-.551	-.911	-.345
0.06	.303	.136	.480	-.518	-.866	-.319
0.07	.324	.149	.506	-.489	-.825	-.296
0.08	.344	.162	.530	-.463	-.790	-.276
0.09	.363	.175	.554	-.439	-.757	-.257
0.1	.382	.187	.576	-.418	-.727	-.240
0.15	.470	.249	.680	-.328	-.603	-.168
0.2	.554	.313	.776	-.256	-.505	-.110
0.25	.638	.379	.869	-.195	-.421	-.061
0.3	.724	.451	.964	-.140	-.346	-.016
0.35	.815	.528	1.062	-.089	-.277	.026
0.4	.911	.614	1.165	-.041	-.212	.066
0.45	1.014	.709	1.275	.006	-.149	.106
<b>0.5</b>	<b>1.128</b>	<b>.815</b>	<b>1.397</b>	<b>.052</b>	<b>-.089</b>	<b>.145</b>
0.55	1.254	.936	1.532	.098	-.029	.185
0.6	1.397	1.075	1.688	.145	.031	.227
0.65	1.561	1.235	1.873	.194	.092	.273
0.7	1.756	1.422	2.100	.245	.153	.322
0.75	1.993	1.645	2.392	.300	.216	.379
0.8	2.296	1.916	2.792	.361	.282	.446

0.85	2.706	2.260	3.386	.432	.354	.530
0.9	3.328	2.742	4.380	.522	.438	.641
0.91	3.499	2.867	4.670	.544	.457	.669
0.92	3.694	3.008	5.010	.568	.478	.700
0.93	3.922	3.169	5.416	.593	.501	.734
0.94	4.192	3.356	5.913	.622	.526	.772
0.95	4.523	3.580	6.541	.655	.554	.816
0.96	4.946	3.859	7.372	.694	.586	.868
0.97	5.521	4.227	8.547	.742	.626	.932
0.98	6.389	4.765	10.420	.805	.678	1.018
0.99	8.043	5.742	14.271	.905	.759	1.154

a. Logarithm base = 10.

### Hasil Analisis Probit Gentamisin terhadap *Bacillus cereus* Replikasi 2

#### Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>a</sup>		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.01	.152	.051	.282	-.818	-1.296	-.550
	0.02	.192	.070	.339	-.716	-1.154	-.470
	0.03	.223	.086	.381	-.651	-1.064	-.420
	0.04	.250	.101	.415	-.603	-.996	-.381
	0.05	.273	.115	.446	-.563	-.941	-.350
	0.06	.295	.128	.474	-.530	-.894	-.324
	0.07	.316	.140	.500	-.500	-.853	-.301
	0.08	.336	.153	.525	-.474	-.816	-.280
	0.09	.355	.165	.548	-.450	-.783	-.261
	0.1	.373	.177	.571	-.428	-.752	-.243
	0.15	.461	.237	.675	-.337	-.625	-.171
	0.2	.545	.299	.771	-.264	-.525	-.113

0.25	.629	.364	.866	-.202	-.439	-.063
0.3	.715	.435	.961	-.146	-.362	-.017
0.35	.806	.512	1.060	-.094	-.291	.025
0.4	.902	.597	1.164	-.045	-.224	.066
0.45	1.007	.692	1.276	.003	-.160	.106
0.5	1.122	.799	1.398	.050	-.098	.146
0.55	1.249	.920	1.536	.097	-.036	.186
0.6	1.394	1.060	1.694	.144	.025	.229
0.65	1.561	1.223	1.881	.193	.087	.274
0.7	1.759	1.414	2.111	.245	.150	.325
0.75	2.001	1.642	2.409	.301	.215	.382
0.8	2.310	1.920	2.818	.364	.283	.450
0.85	2.731	2.274	3.428	.436	.357	.535
0.9	3.370	2.768	4.458	.528	.442	.649
0.91	3.546	2.897	4.760	.550	.462	.678
0.92	3.747	3.042	5.115	.574	.483	.709
0.93	3.982	3.207	5.539	.600	.506	.743
0.94	4.261	3.399	6.060	.630	.531	.782
0.95	4.604	3.629	6.719	.663	.560	.827
0.96	5.041	3.916	7.593	.703	.593	.880
0.97	5.637	4.296	8.835	.751	.633	.946
0.98	6.539	4.850	10.821	.816	.686	1.034
0.99	8.264	5.859	14.933	.917	.768	1.174

a. Logarithm base = 10.

### Hasil Analisis Probit Gentamisin terhadap *Bacillus cereus* Replikasi 3

#### Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>a</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0.01	.145	.056	.259	-.840	-1.254	-.586
0.02	.184	.077	.315	-.736	-1.116	-.502
0.03	.214	.094	.356	-.670	-1.029	-.448
0.04	.240	.109	.391	-.620	-.964	-.408
0.05	.263	.123	.422	-.579	-.910	-.375
0.06	.285	.136	.450	-.545	-.865	-.347
0.07	.306	.149	.476	-.515	-.825	-.322
0.08	.325	.162	.501	-.488	-.790	-.300
0.09	.344	.175	.524	-.463	-.758	-.280
0.1	.362	.187	.547	-.441	-.728	-.262
0.15	.450	.248	.653	-.347	-.605	-.185
0.2	.534	.310	.752	-.273	-.508	-.124
0.25	.618	.376	.849	-.209	-.425	-.071
0.3	.705	.446	.948	-.152	-.351	-.023
0.35	.797	.522	1.050	-.099	-.282	.021
0.4	.895	.606	1.158	-.048	-.217	.064
0.45	1.001	.700	1.275	.001	-.155	.105
<b>0.5</b>	<b>1.118</b>	<b>.805</b>	<b>1.403</b>	<b>.048</b>	<b>-.094</b>	<b>.147</b>
0.55	1.249	.925	1.545	.096	-.034	.189
0.6	1.397	1.062	1.708	.145	.026	.232
0.65	1.569	1.224	1.899	.196	.088	.278
0.7	1.773	1.415	2.130	.249	.151	.328
0.75	2.023	1.648	2.423	.306	.217	.384
0.8	2.343	1.939	2.817	.370	.288	.450
0.85	2.781	2.320	3.390	.444	.366	.530

0.9	3.449	2.867	4.343	.538	.457	.638
0.91	3.634	3.011	4.620	.560	.479	.665
0.92	3.845	3.173	4.945	.585	.502	.694
0.93	4.092	3.359	5.333	.612	.526	.727
0.94	4.386	3.577	5.807	.642	.553	.764
0.95	4.747	3.838	6.407	.676	.584	.807
0.96	5.210	4.164	7.199	.717	.620	.857
0.97	5.841	4.598	8.320	.767	.663	.920
0.98	6.801	5.235	10.103	.833	.719	1.004
0.99	8.642	6.404	13.762	.937	.806	1.139

a. Logarithm base = 10.

KH <sub>50</sub>					
KH <sub>50</sub>	Persentase Penghambatan (%)			Rata-rata Persentase Penghambatan (%) ± SD	CV (%b/b)
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3		
Ekstrak Uji	30,476	37,514	26,917	31,636 ± 5,393	17,047
Gentamisin	1,128	1,122	1,118	1,123 ± 0,005	0,448