



**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
TUMBUHAN EPIFIT LIKEN *Parmelia cetrata* Ach.
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa***

SKRIPSI

Oleh

**Nadya Dini Lestari
NIM 142210101045**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
TUMBUHAN EPIFIT LIKEN *Parmelia cetrata* Ach.
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Pendidikan Strata Satu (S1) Fakultas Farmasi
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

**Nadya Dini Lestari
NIM 142210101045**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibu Sri Wahjuni, Bapak Mochtar Boediyono, serta seluruh keluarga;
2. Guru-guruku dari TK Kartika Jaya, SDN Sidoklumpuk, SMPN 1 Sidoarjo, SMAN 1 Sidoarjo, serta segenap dosen dan teknisi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membimbing dan memberikan ilmu berharga;
3. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTO

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan, sesungguhnya bersama
kesulitan ada kemudahan.

(Terjemahan Surah Al –Insyirah ayat 5-6)¹⁾

¹⁾ Kementerian Agama Republik Indonesia. 2016. *Al-Qur'an Terjemah dan Azbabun Nuzul*. Solo: Penerbit Fatwa

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Nadya Dini Lestari

NIM : 142210101045

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Epifit Liken *Parmelia cetrata* Ach. terhadap *Pseudomonas aeruginosa*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, serta 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 adanya paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari ini tidak benar.

Jember, 16 Juli 2018

Yang menyatakan,



Nadya Dini Lestari

NIM 142210101045

SKRIPSI

**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
TUMBUHAN EPIFIT LIKEN *Parmelia cetrata* Ach.
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa***

Oleh

**Nadya Dini Lestari
NIM 142210101045**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Ari Satia N., SF., GDipSc., MSc-Res., PhD., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Epifit Liken *Parmelia cetrata* Ach. terhadap *Pseudomonas aeruginosa*” karya Nadya Dini Lestari telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin, 16 Juli 2018

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,



Ari S. N., SF., GDipSc., MSc-Res., PhD., Apt.
NIP 197807212003121001

Dosen Pembimbing Anggota,



Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP 198504282009121004

Tim Penguji

Dosen Penguji I,



Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D.
NIP 196902011994031002

Dosen Penguji II,



Dewi Dianasari S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP 198712082014042002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



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

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Epifit Liken *Parmelia cetrata* Ach. terhadap *Pseudomonas aeruginosa*; Nadya Dini Lestari, 142210101045; 2018; 140 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyakit infeksi adalah masalah kesehatan yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen seperti bakteri. Menurut WHO pada tahun 2016, penyakit infeksi dapat membunuh hampir 9 juta orang tiap tahunnya. Bakteri memiliki kemampuan untuk beradaptasi, sehingga adanya penelitian dan pengembangan agen antibakteri baru tetap penting untuk dilakukan. Skrining aktivitas antibakteri terhadap suatu bahan alam dapat menjadi langkah awal dalam penelitian dan pengembangan agen antibakteri. Skrining aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan fokus terhadap bakteri gram negatif seperti *Pseudomonas aeruginosa*, karena kebanyakan antibakteri yang dikembangkan saat ini lebih fokus menarget bakteri gram positif. Bakteri gram negatif menjadi tantangan dalam penelitian dan pengembangan antibakteri karena memiliki susunan dinding sel yang kompleks sehingga mempersulit antibakteri masuk dan bekerja dalam sel bakteri.

Penemuan agen antibakteri seperti penisilin dari jamur menyebabkan liken sebagai tumbuhan tingkat rendah mulai diteliti potensi aktivitas antibakterinya. Liken merupakan hasil simbiosis antara jamur dan alga atau sianobakteri. Belum terdapat dokumen yang menyatakan estimasi jumlah spesies liken di Indonesia. Penelitian tentang bioaktivitas liken juga masih terbatas di Indonesia, dan cenderung fokus kepada liken *Usnea* spp. dan *Stereocaulon* spp. Berdasarkan hal tersebut, penelitian tentang aktivitas antibakteri liken *Parmelia cetrata* Ach. (*P. cetrata*) terhadap bakteri gram negatif *P. aeruginosa* dilakukan sebagai bentuk eksplorasi liken dan sebagai referensi dalam menunjang penelitian dan pengembangan antibakteri.

Liken *P. cetrata* pada penelitian ini diekstraksi secara maserasi dengan metanol dan difraksinasi secara partisi cair-cair dengan heksana, diklorometana, etil asetat, dan air. Skrining fitokimia dilakukan terhadap seluruh ekstrak dan fraksi liken dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Berdasarkan hasil skrining fitokimia, ekstrak metanol mengandung senyawa golongan antrakinon, flavonoid, fenolat, terpenoid atau steroid bebas; fraksi heksana mengandung senyawa golongan antrakinon dan terpenoid atau steroid bebas; fraksi diklorometana mengandung senyawa golongan antrakinon, flavonoid, serta fenolat; dan fraksi etil asetat mengandung senyawa fenolat.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap ekstrak dan fraksi liken *P. cetrata* dengan kontrol positif gentamisin untuk memastikan metode yang dilakukan benar. Uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini dilakukan dengan metode mikrodilusi menggunakan *microplate-96-well* sesuai protokol yang ditetapkan oleh *Clinical Laboratory Standard Institue*. Pengujian dilakukan menggunakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, dengan suhu inkubasi 37°C dan waktu inkubasi sampel 20 jam.

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa*, persentase penghambatan pertumbuhan bakteri oleh gentamisin telah memenuhi rentang yang disyaratkan yakni memiliki konsentrasi hambat minimum (*Minimum Inhibitory Concentration/MIC*) sebesar 0,5-2 µg/mL. Uji aktivitas antibakteri pada ekstrak dan fraksi menunjukkan bahwa ekstrak metanol liken memiliki IC_{50} 1334,248 ± 33,167 µg/mL, fraksi heksana memiliki IC_{50} 1171,547 ± 27,083 µg/mL, fraksi diklorometana memiliki IC_{50} 1047,168 ± 28,018 µg/mL, fraksi etil asetat memiliki IC_{50} 946,621 ± 26,393 µg/mL, dan residu liken memiliki IC_{50} 2407,381 ± 204,414 µg/mL. Nilai IC_{50} terkecil dicapai oleh fraksi etil asetat liken *P. cetrata*, namun menurut literatur standar nilai IC_{50} yang baik pada pengujian senyawa anti-infektif adalah <100 µg/mL sehingga dapat diketahui bahwa ekstrak dan fraksi liken *P. cetrata* tidak poten dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Subhanallahu Wa Ta'ala atas segala rahmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Epifit Liken *Parmelia cetrata* Ach. terhadap *Pseudomonas aeruginosa*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan Pendidikan Strata Satu (S1) Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dari berbagai pihak, maka dari itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ibu Sri Wahjuni, Bapak Mochtar Boediyono, Om Bambang, Tante Arik, Budhe Tri, serta seluruh keluarga yang telah memberikan dukungan moral dan materi.
2. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt. atas kesempatan yang diberikan untuk menyelesaikan skripsi.
3. Bapak Ari Satia Nugraha, SF., GDipSc., MSc-Res., PhD., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama dan Bapak Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, serta memberi fasilitas bagi penulis dalam menyusun skripsi.
4. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Dewi Dianasari S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji II atas segala kritik dan saran yang diberikan selama penyusunan skripsi.
5. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa memberikan bimbingan akademik selama penulis kuliah di Fakultas Farmasi Universitas Jember.
6. Ibu Wayan, Mbak Hani, Bu Itus, Mbak Parkha, Ibu Widi, Mbak NH, Mbak Frida, Mas Aryo, Mas Erwan, Mbak Azizah, Mbak Ning yang telah membantu penulis saat melakukan penelitian di laboratorium.

7. Dita, Mbak Desy Exo, Intan Pimu, Illa Micol, Putri, Ririn, Bella, Irma, Farah, Cicik, Ma'i, Yuli, Kak Yoko Ito, dan Kak Eri Ito sebagai teman cerita bagi penulis.
8. Rekan kerja *Lichen Project* (Yuvi dan Tinton) yang telah berjuang bersama dalam menyelesaikan proyek penelitian uji bioaktivitas liken.
9. Segenap anggota grup riset *Drug Discovery Reserch Group*.
10. Segenap keluarga Majelis Permusyawaratan Mahasiswa tahun 2015, Badan Permusyawaratan Mahasiswa tahun 2016-2017, Mawapres UNEJ 2017, KKN UMD 51 UNEJ yang menjadi sumber motivasi bagi penulis.
11. Seluruh teman-teman Fakultas Farmasi angkatan 2014 "Pharmagen".
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan penulis satu per satu.

Hanya do'a yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis mendapatkan balasan dari Allah Subhanallahu Wa Ta'ala. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi banyak orang.

Jember, 16 Juli 2018

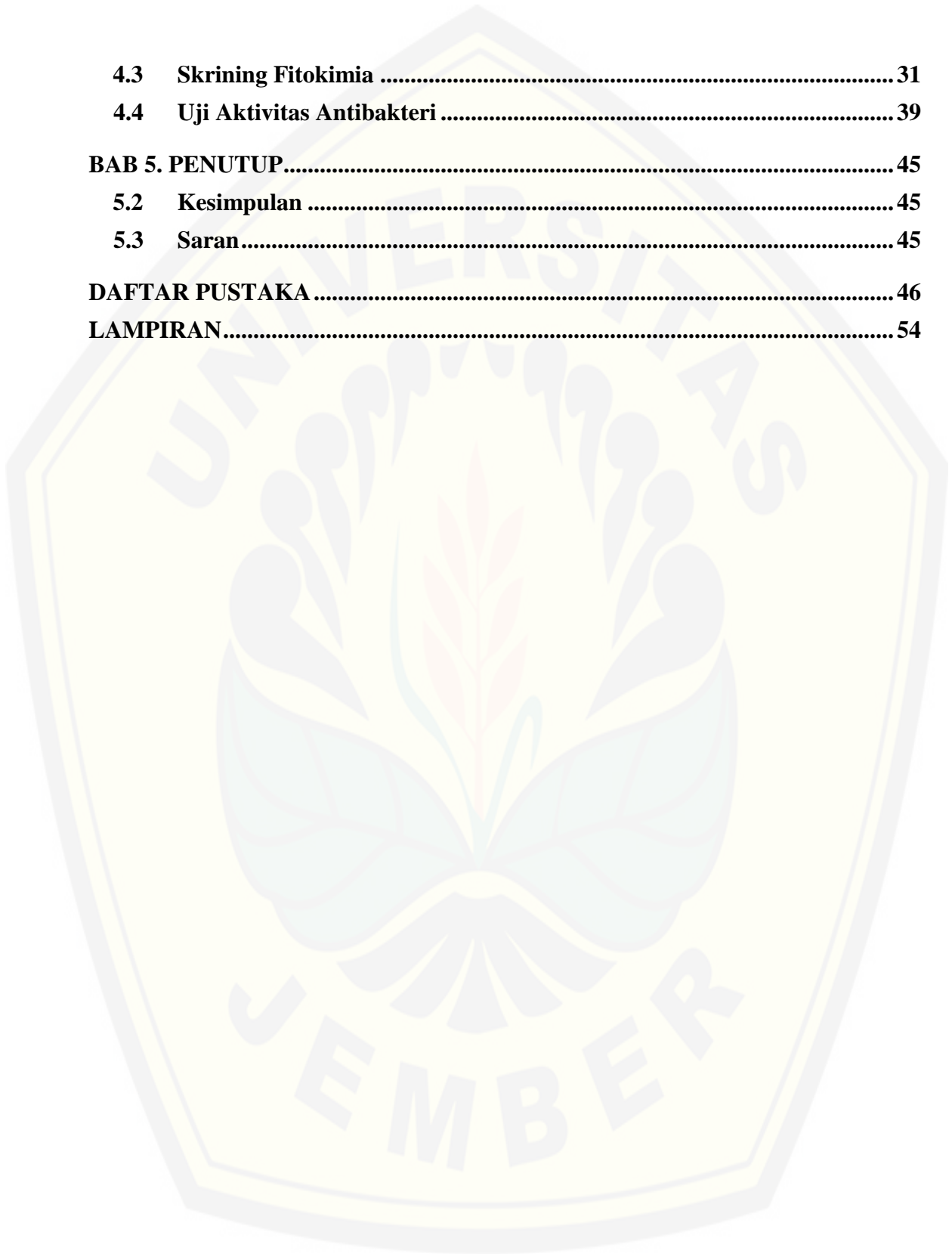
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR RUMUS	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Penyakit Infeksi	5
2.1.1 Infeksi Bakteri	5
2.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
2.2 Antibakteri	7
2.3 Liken	8
2.3.1 Deskripsi	8
2.3.2 Habitat	8

2.3.3	Morfologi	9
2.3.4	Metabolit Sekunder Liken.....	10
2.4	Ekstraksi dan Fraksinasi	12
2.4.1	Ekstraksi.....	12
2.4.2	Fraksinasi	12
2.5	Skrining Fitokimia	13
2.6	Uji Aktivitas Antibakteri	13
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	15
3.1	Jenis Penelitian	15
3.2	Rancangan Penelitian.....	15
3.3	Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.4	Alat dan Bahan	16
3.4.1	Alat.....	16
3.4.1	Bahan.....	17
3.5	Variabel Penelitian	17
3.5.1	Variabel Bebas	17
3.5.2	Variabel Terikat	18
3.5.3	Variabel Terkendali.....	18
3.6	Definisi Operasional	18
3.7	Prosedur Penelitian	19
3.7.1	Determinasi Tumbuhan Epifit Liken	19
3.7.2	Pembuatan Simplisia dan Serbuk Liken <i>P. cetrata</i>	19
3.7.3	Pembuatan Ekstrak Metanol Liken <i>P. cetrata</i>	19
3.7.4	Skrining Fitokimia	20
3.7.5	Uji Aktivitas Antibakteri.....	22
3.7.6	Pembuatan Fraksi Liken <i>P. cetrata</i>	26
3.8	Analisis Data	26
3.9	Skema Penelitian	28
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1	Determinasi Tumbuhan Epifit Liken	29
4.2	Ekstraksi dan Fraksinasi Liken <i>P. cetrata</i>.....	29

4.3	Skrining Fitokimia	31
4.4	Uji Aktivitas Antibakteri	39
BAB 5. PENUTUP.....		45
5.2	Kesimpulan	45
5.3	Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA		46
LAMPIRAN.....		54



DAFTAR TABEL

	Halaman
2. 1 Berbagai penelitian aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder liken.....	11
4. 1 Rendemen hasil fraksinasi liken <i>P. cetrata</i>	30
4. 2 Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol liken <i>P. cetrata</i> dengan menggunakan metode KLT.....	31
4. 3 Hasil skrining fitokimia fraksi liken <i>P. cetrata</i> dengan menggunakan metode KLT	32
4. 4 Tabel konsentrasi uji ekstrak dan fraksi liken <i>P. cetrata</i>	40
4. 5 Tabel persentase penghambatan pertumbuhan <i>P. aeruginosa</i> oleh kontrol negatif DMSO 1%	41
4. 6 Tabel persentase penghambatan pertumbuhan <i>P. aeruginosa</i> oleh kontrol positif gentamisin	41
4. 7 Tabel IC ₅₀ ekstrak dan fraksi liken <i>P. cetrata</i> terhadap pertumbuhan bakteri <i>P. aeruginosa</i>	42

DAFTAR GAMBAR

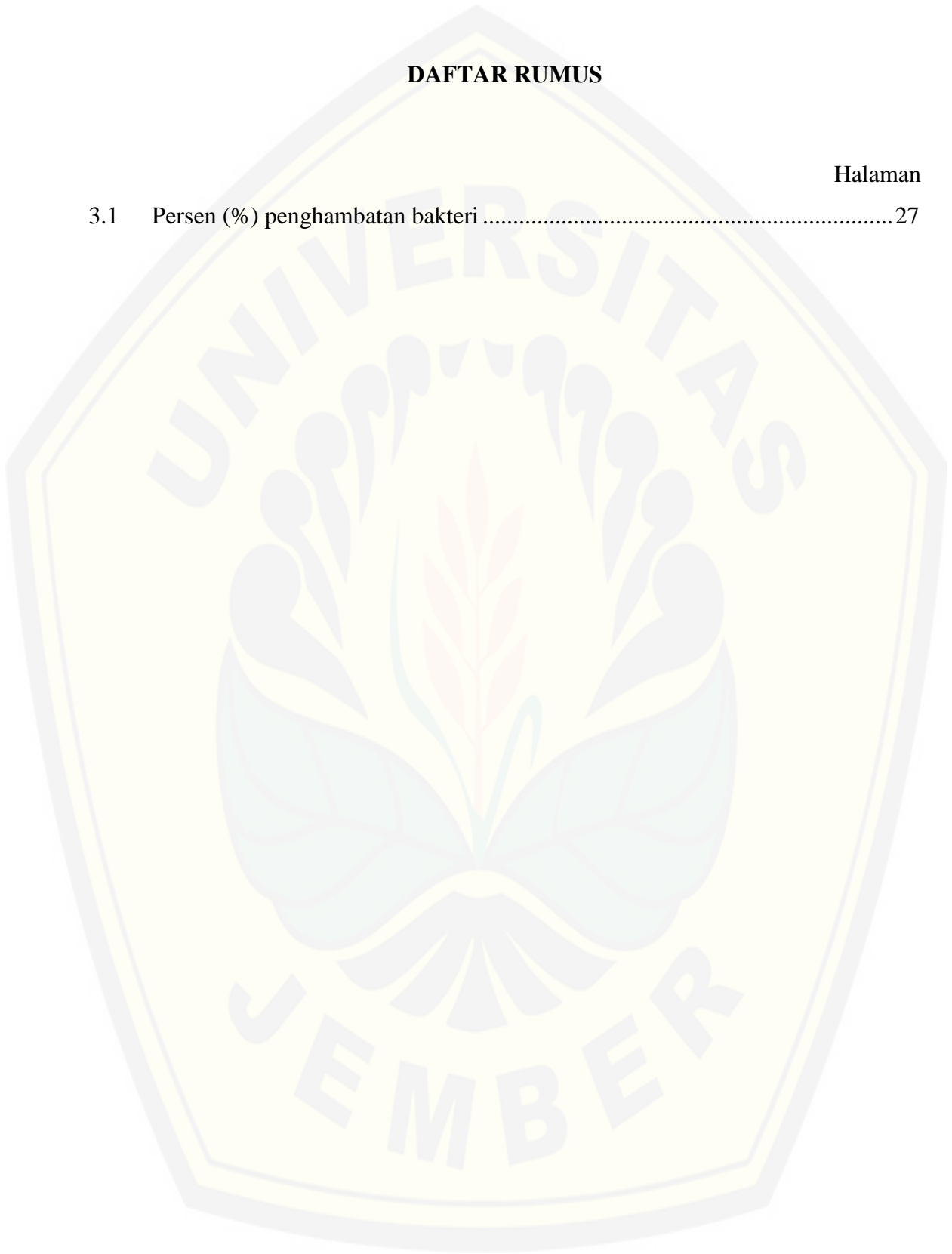
	Halaman
2. 1	Morfologi <i>P. aeruginosa</i> strain ATCC 27853 berbentuk batang dengan ukuran (0.5-0.8 x 1.5-3 μm). Garis skala pada A adalah 5 μm (VetBact.org, 2015) 7
2. 2	Berbagai macam morfologi liken A) Crustose, B) Foliose, dan C) Fruticose..... 9
2. 3	Struktur umum A) Depside, B) Depsidon, dan C) Dibenzofuran 10
3. 1	Skema rancangan penelitian uji antibakteri metode mikrodilusi..... 16
3. 2	Pemetaan mikrodilusi pada <i>microplate-96-well</i> 25
3. 3	Skema alur fraksinasi bertingkat Liken <i>Parmelia cetrata</i> Ach..... 26
3. 4	Skema penelitian secara keseluruhan..... 28
4. 1	Liken <i>Parmelia cetrata</i> Ach. 29
4. 2	Gambar proses A) Ekstraksi secara maserasi, B) Fraksinasi partisi cair-cair... 31
4. 3	Skrining fitokimia ekstrak metanol liken <i>P. cetrata</i> menunjukkan hasil negatif alkaloid 33
4. 4	Skrining senyawa golongan antrakinon pada A) Ekstrak metanol, B) Fraksi heksana, C) Fraksi diklorometana, D) Fraksi etil asetat, dan E) Residu liken <i>P. cetrata</i> 34
4. 5	Identifikasi senyawa golongan flavonoid pada A) Ekstrak metanol, B) Fraksi heksana, C) Fraksi diklorometana, D) Fraksi etil asetat, dan E) Residu liken <i>P. cetrata</i> 35
4. 6	Identifikasi senyawa golongan fenolat pada A) Ekstrak metanol, B) Fraksi heksana, C) Fraksi diklorometana, D) Fraksi etil asetat, dan E) Residu liken <i>P. cetrata</i> 36
4. 7	Hasil uji KLT menunjukkan ekstrak metanol liken <i>P. cetrata</i> tidak mengandung sapogenin triterpenoid atau sapogenin steroid karena tidak terdapat noda warna ungu atau merah ungu pada lempeng KLT 37

4. 8 Skringing fitokimia senyawa terpenoid atau steroid bebas pada A) Ekstrak metanol, B) Fraksi heksana, C) Fraksi diklorometana, D) Fraksi etil asetat, E) Residu liken *P. cetrata* 38



DAFTAR RUMUS

	Halaman
3.1 Persen (%) penghambatan bakteri	27



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
4.1 Hasil Determinasi Liken <i>P. cetrata</i>	54
4.2 Perhitungan Rendemen Ekstrak Metanol, Fraksi Heksana, Fraksi Diklorometana, Fraksi Etil Asetat dan Residu Liken <i>P. cetrata</i>	55
4.3 Perhitungan Pembuatan Media CAMHB	58
4.4 Perhitungan Konsentrasi Kontrol Positif Gentamisin untuk Uji Aktivitas Antibakteri	61
4.5 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Metanol, Fraksi Heksana, Fraksi Diklorometana, Fraksi Etil Asetat dan Residu Liken <i>P. cetrata</i> untuk Uji Aktivitas Antibakteri Metode Mikrodilusi	63
4.6 Data Hasil dan Persentase Penghambatan Kontrol Positif/Gentamisin terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>P. aeruginosa</i>	69
4.7 IC ₅₀ Kontrol Positif Gentamisin	74
4.8 Data Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol, Fraksi Heksana, Fraksi Diklorometana, Fraksi Etil Asetat dan Residu Liken <i>P. cetrata</i>	79
4.9 IC ₅₀ Ekstrak Metanol, Fraksi Heksana, Fraksi Diklorometana, Fraksi Etil Asetat dan Residu Liken <i>P. cetrata</i>	97

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan masalah kesehatan yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen seperti bakteri, virus, parasit atau jamur, dan sifatnya dapat menular. Penyakit infeksi tidak dapat diabaikan karena menurut World Health Organization (WHO) (2016) penyakit ini dapat membunuh hampir 9 juta orang tiap tahunnya. Umumnya kematian karena penyakit infeksi terjadi pada orang-orang miskin yang tinggal di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah (WHO, 2012).

Penemuan antibiotik, atau antibakteri, pada abad ke-20 menjadi solusi untuk menangani penyakit infeksi karena bakteri. Penyakit infeksi semakin berkembang karena bakteri memiliki kemampuan untuk beradaptasi, sehingga penelitian dan pengembangan agen antibakteri baru tetap penting untuk dilakukan (Nigam dkk., 2014). Skrining aktivitas antibakteri suatu bahan alam terhadap berbagai bakteri dapat menjadi langkah awal dalam penelitian dan pengembangan agen antibakteri. Skrining dapat dilakukan dengan fokus untuk mengetahui aktivitas bahan alam tertentu terhadap bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif dapat menjadi perhatian karena kebanyakan agen antibakteri yang dikembangkan saat ini lebih menargetkan bakteri gram positif, dan hanya ada sedikit pilihan antibakteri terhadap bakteri gram negatif (WHO, 2017a). Bakteri gram negatif juga menjadi tantangan dalam penelitian dan pengembangan antibakteri karena memiliki dinding sel yang kompleks, serta memiliki pompa efluks yang dapat mencegah antibakteri masuk ke dalam sel bakteri. Salah satu bakteri gram negatif yang dapat dijadikan fokus penelitian dan pengembangan antibakteri adalah *Pseudomonas aeruginosa* (Wise dan Piddock, 2010). *P. aeruginosa* merupakan salah satu bakteri patogen prioritas dalam penelitian dan pengembangan antibakteri menurut WHO (2017a). Angka kejadian infeksi bakteri ini di Amerika adalah 0,4% dari seluruh pasien yang masuk rumah sakit. *P.*

aeruginosa masuk dalam urutan ke-4 dari bakteri yang paling banyak diisolasi pada pasien infeksi nosokomial (Environmental & Public Health Consultants, 2018). Beberapa kondisi yang disebabkan karena infeksi *P. aeruginosa* antara lain bakteremia, infeksi saluran kemih, endokarditis, serta pneumonia (Friedrich, 2017).

Beberapa obat-obatan dihasilkan dari jamur (Zhu dkk., 2011), termasuk penisilin yang mengawali era antibiotik (Drews, 2000). Ditemukannya penisilin dari jamur menyebabkan liken mulai diteliti untuk mengetahui aktivitas antibakteri sekitar tahun 1940. Liken merupakan organisme yang terbentuk karena adanya simbiosis antara jamur dengan alga atau sianobakteri (Dayan dan Romagni, 2001). Jamur secara umum tidak mampu menghasilkan makanannya sendiri, maka dari itu jamur bersimbiosis dengan partner yang dapat melakukan fotosintesis atau menghasilkan makanannya sendiri, yakni dalam hal ini adalah alga atau sianobakteri (Desbenoit dkk., 2004).

Liken dapat hidup di batu, kayu mati, tanah, tulang binatang, logam, kulit pohon, maupun gurun pasir (Desbenoit dkk., 2004). Terdapat lebih dari 20.000 spesies liken telah teridentifikasi dan tersebar dari daerah Arktik hingga daerah tropis (Sesal dkk., 2016). Kemampuan liken dalam bertahan hidup pada kondisi panas, dingin, maupun kering tentunya tidak terlepas dari metabolit sekunder yang dihasilkan, sehingga liken bisa melindungi diri dari lingkungan, mikroba, predator, maupun kompetitornya. Liken diketahui memiliki lebih dari 1.000 macam metabolit sekunder (Shrestha dan St. Clair, 2013), termasuk di antaranya depsida, depsidon, dan dibenzofuran yang merupakan jenis metabolit unik dari liken (Yuan, 2016). Liken diketahui berpotensi memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri, antioksidan, antiproliferatif, antikanker, dan antiprotozoa (Shrestha dan St. Clair, 2013). Skrining aktivitas antibakteri liken dilakukan pertama kali oleh Burkholder dkk. (1944), membuktikan bahwa 27 dari 42 spesies liken yang diteliti aktif terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan/atau *Bacillus subtilis*. Spesies liken tertentu juga memiliki aktivitas terhadap bakteri gram negatif, seperti pada penelitian oleh Yuan

(2016) yang menunjukkan ekstrak kasar *Evernia divaricata* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa*.

Hingga saat ini, belum terdapat dokumen yang menyatakan estimasi jumlah spesies liken di seluruh Indonesia. Penelitian tentang bioaktivitas liken di Indonesia juga masih terbatas. Beberapa penelitian yang ada cenderung fokus kepada liken *Usnea* spp. (Lohezic-Le Devehat dkk., 2007; Solihin, 2015) dan *Stereocaulon* spp. (Ismed dkk., 2016; Ismed dkk., 2017). Hal ini membuktikan kurangnya eksplorasi tentang bioaktivitas liken di Indonesia.

Berdasarkan uraian di atas, eksplorasi liken dapat berpotensi dalam memperkaya informasi mengenai keanekaragaman hayati di Indonesia. Skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri terhadap liken *Parmelia cetrata* Ach. (*P. cetrata*) dapat dilakukan sebagai referensi dalam menunjang penelitian dan pengembangan obat antibakteri. Skrining fitokimia akan dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam sampel. Uji aktivitas antibakteri akan dilakukan dengan metode mikrodilusi untuk mengetahui nilai konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri sebesar 50% atau *half maximal inhibitory concentration* (IC₅₀) (Kolarević dkk., 2016).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, masalah yang dapat dirumuskan pada penelitian ini antara lain:

1. Apa saja kandungan fitokimia dari ekstrak metanol, fraksi heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat, dan residu tumbuhan epifit liken *P. cetrata*?
2. Berapa nilai IC₅₀ dari ekstrak metanol, fraksi heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat, dan residu tumbuhan epifit liken *P. cetrata* terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini antara lain :

1. Mengetahui kandungan fitokimia dari ekstrak metanol, fraksi heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat, dan residu tumbuhan epifit liken *P. cetrata*
2. Mengetahui nilai IC_{50} dari ekstrak metanol, fraksi heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat, dan residu tumbuhan epifit liken *P. cetrata* terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa*

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang ingin didapatkan dari penelitian ini antara lain :

1. Eksplorasi liken di Indonesia untuk memberikan informasi mengenai sumber antibakteri baru
2. Dapat digunakan sebagai referensi untuk isolasi senyawa baru dalam penelitian dan pengembangan obat antibakteri

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Infeksi

2.1.1 Infeksi Bakteri

Infeksi adalah keadaan yang terjadi ketika terdapat invasi suatu inang oleh mikroorganisme (Irving dkk., 2005). Penyakit infeksi sendiri merupakan masalah kesehatan yang disebabkan oleh mikroorganisme seperti bakteri, virus, jamur, atau parasit yang bersifat patogen (WHO, 2017b). Berdasarkan data estimasi penyebab kematian di dunia oleh WHO pada tahun 2015, sebesar 15,78% kematian disebabkan oleh penyakit infeksi (WHO, 2016). Penyakit infeksi dapat menular baik secara langsung atau tak langsung. Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, penyakit infeksi yang menular dapat dikategorikan berdasarkan cara penularannya, yakni melalui: (1) udara, contohnya adalah tuberkulosis, pneumonia, serta penyakit infeksi saluran pernafasan akut (ISPA); (2) makanan, minuman, atau air, contohnya adalah diare dan hepatitis; (3) vektor, contohnya adalah malaria (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013).

Penyakit infeksi karena bakteri patogen dapat disebabkan oleh bakteri gram positif atau gram negatif. Bakteri gram negatif menjadi sorotan dalam penyakit infeksi karena lebih berpotensi menyebabkan sepsis dibanding bakteri gram positif (Alexandraki dan Palacio, 2010). Bakteri gram negatif memiliki tingkat patogenisitas yang bervariasi antar spesies, namun secara umum memiliki dinding sel dengan endotoksin pada bagian luarnya. Kebanyakan penyakit yang disebabkan oleh bakteri gram negatif adalah infeksi saluran napas, gastroenteritis, dan juga penyebab keracunan makanan. Beberapa contoh bakteri gram negatif yang dapat menyebabkan infeksi antara lain *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Irving dkk., 2005).

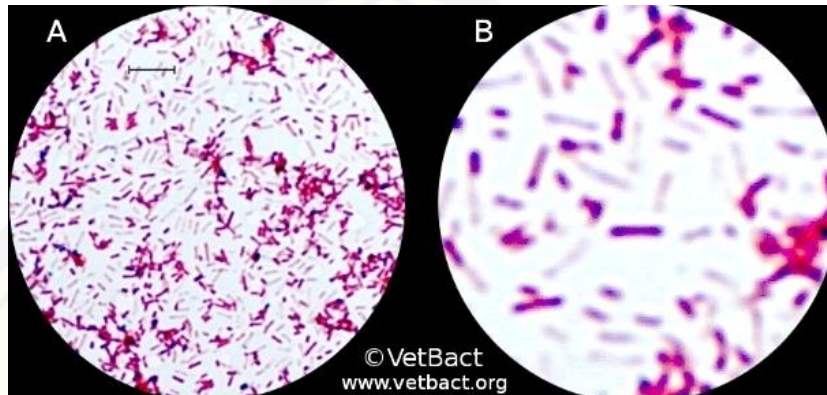
2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri dalam genus *Pseudomonas* biasa hidup di tanah, air, atau di permukaan tumbuhan dan hewan. Genus ini biasanya merupakan patogen bagi tumbuhan, namun beberapa *strain* termasuk patogen bagi manusia (NCBI, 2017). Berikut adalah taksonomi dari *Pseudomonas aeruginosa* (VetBact.org, 2015):

Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Spesies	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

P. aeruginosa adalah bakteri gram negatif yang secara morfologis akan membentuk koloni berwarna kehijauan, datar, dan berdiameter 2-4 mm. Secara mikroskopis *P. aeruginosa* berbentuk batang (Gambar 2.1). Bakteri ini dapat menghasilkan lipopolisakarida (LPS) dan eksotoksin yang dapat mengganggu sintesis protein inang (VetBact.org, 2015).

P. aeruginosa merupakan salah satu bakteri yang berperan dalam infeksi nosokomial atau infeksi yang terjadi ketika di rumah sakit. Bakteri ini biasanya menginfeksi pasien dengan imunitas lemah, terutama pada kondisi neutropenia atau jumlah neutrofil turun. *P. aeruginosa* berperan dalam menyebabkan infeksi saluran nafas yang berujung kematian pada pasien fibrosis sistik. Selain itu beberapa kondisi yang mungkin terjadi karena infeksi oleh *P. aeruginosa* antara lain bakteremia (pada pasien neutropenia), endokarditis (pada pasien pengguna obat intravena), pneumonia (pada pasien pengguna selang endotrakeal), infeksi saluran kemih, luka pada kornea (pada pasien pengguna lensa kontak) (Hancock dan Speert, 2000).



Gambar 2.1 Morfologi *P. aeruginosa* strain ATCC 27853 berbentuk batang dengan ukuran (0.5-0.8 x 1.5-3 µm). Garis skala pada A adalah 5 µm (VetBact.org, 2015)

Sebagai bakteri gram negatif, *P. aeruginosa* memiliki susunan dinding sel kompleks sehingga mempersulit agen antibakteri masuk ke dalam sel. Bakteri gram negatif secara umum memiliki lapisan peptidoglikan tipis yang berada di antara membran dalam dan membran luar. Membran luar hanya permeabel bagi molekul kecil dan hidrofobik, sedangkan membran dalam hanya permeabel bagi senyawa lipofil. Terdapat pompa efluks pada membran dalam yang dapat mengeluarkan kembali molekul asing yang masuk ke dalam sel. Susunan dinding sel bakteri gram negatif ini secara alami dapat menghambat masuknya agen antibakteri ke dalam sel bakteri (Singh dkk., 2017), hal inilah yang menjadi tantangan dalam penelitian dan pengembangan agen antibakteri gram negatif.

2.2 Antibakteri

Antimikroba adalah senyawa yang dapat membunuh atau mengontrol pertumbuhan mikroorganisme dalam inang, sedangkan antibakteri adalah agen antimikroba yang berfungsi untuk mengatasi atau mencegah infeksi bakteri (Madigan dkk., 2015). Secara umum, antibakteri diharapkan dapat bekerja pada sel bakteri secara spesifik tanpa membahayakan inang. Komponen spesifik bakteri yang dapat

dijadikan target contohnya adalah dinding sel bakteri, misalnya seperti pada penisilin yang menghambat sintesis dinding sel bakteri. Agen antibakteri dapat bersifat bakteriostatik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, atau bersifat bakterisidal yang dapat membunuh bakteri. Antibakteri yang bersifat bakterisidal cenderung digunakan pada keadaan infeksi berat (misalnya pada kasus endokarditis) atau infeksi yang terjadi pada pasien immunosupresi (Irving dkk., 2005). Hingga saat ini, terdapat 42 antibakteri baru dalam tahap uji klinis, dan di antaranya hanya terdapat 12 antibakteri yang menunjukkan aktivitas terhadap bakteri gram negatif (WHO, 2017a)

2.3 Liken

2.3.1 Deskripsi

Liken merupakan organisme yang terbentuk dari simbiosis antara *mycobiont* dan satu atau lebih *photobiont*. *Mycobiont* dalam hal ini adalah jamur (Kingdom Fungi) dan *photobiont* dapat berupa alga (Kingdom Protista) atau sianobakteri (Kingdom Bakteri). *Mycobiont* adalah bagian yang dominan pada simbiosis ini dan berfungsi melindungi *photobiont* dari sinar matahari yang sangat panas sehingga terhindar dari kekeringan (Rankovic dan Kosanic, 2015). Adapun *photobiont* dalam simbiosis ini berperan dalam menyuplai makanan dengan fotosintesis, karena golongan jamur tidak dapat menghasilkan makanannya sendiri (Desbenoit dkk., 2004).

2.3.2 Habitat

Liken diketahui dapat bertahan hidup bahkan di kondisi ekstrem. Lebih dari 20.000 spesies liken tersebar dari Arktik hingga daerah tropis (Sesal dkk., 2016). Liken hidup baik di tundra Arktik dan Antartika, tundra Alpine, stepa, serta daerah gurun. Kebanyakan liken tahan terhadap kondisi kekeringan, suhu ekstrem, dan baik pada dataran tinggi ataupun rendah (Hock, 2009). Organisme ini dapat hidup di permukaan batu, tanah, pohon, daun, atau bahkan di zona pasang surut (Dayan dan

Romagni, 2001). Liken berperan dalam menjaga ekosistem, contohnya liken memperbaiki lingkungan yang tandus dengan cara menghasilkan metabolit sekunder yang dapat memecah batu-batuan sehingga menjadi tanah yang dapat ditumbuhi tumbuhan (Dayan dan Romagni, 2001).

2.3.3 Morfologi

Morfologi liken sangat beragam. Jamur sebagai partner dominan pada simbiosis ini menyusun 50-90% biomassa liken (Hock, 2009). Liken tidak memiliki batang atau daun hijau seperti tumbuhan berbunga, namun liken memiliki berbagai macam warna dari cerah hingga pucat.

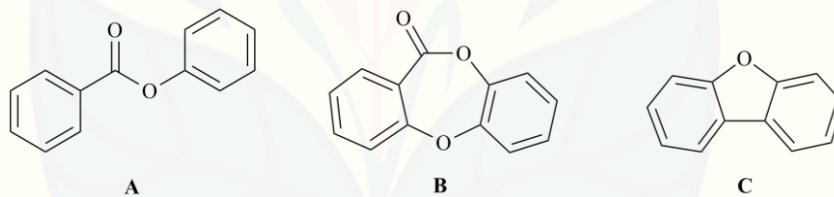
Liken biasa diklasifikasikan berdasarkan morfologi atau bentuk pertumbuhannya, yakni Crutose, Foliose dan Fruticose (Gambar 2.2). Spesies yang berbeda namun dalam genus sama mungkin saja memiliki bentuk pertumbuhan yang berbeda (Desbenoit dkk., 2004). Liken Crustose berbentuk pipih seperti kerak yang melekat erat pada tempat tumbuhnya (batu, pohon atau tanah), jenis ini sulit untuk dilepas dari tempat tumbuhnya. Liken Foliose bentuknya seperti daun dengan sisi atas dan bawah yang tidak melekat terlalu erat pada tempat tumbuhnya (longgar). Liken Fruticose memiliki bentuk seperti semak, pita, atau rambut yang bercabang-cabang dan terjumbai. Liken Fruticose biasanya lebih suka tumbuh di daerah yang basah atau lembab (Dayan dan Romagni, 2001).



Gambar 2.2 Berbagai macam morfologi liken A) Crustose, B) Foliose, dan C) Fruticose

2.3.4 Metabolit Sekunder Liken

Liken menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer liken memiliki fungsi struktural dan berperan dalam metabolisme sel (Shrestha dan St. Clair, 2013). Liken menghasilkan metabolit sekunder untuk melindungi diri dari lingkungan, mikroba, predator maupun kompetitornya. Mayoritas metabolit sekunder pada liken dihasilkan oleh *mycobiont* atau partner dominannya (jamur) (Dayan dan Romagni, 2001). Metabolit sekunder yang dihasilkan liken kebanyakan mencapai 5-10% bobot keringnya (Shrestha dan St. Clair, 2013). Metabolit sekunder ini biasanya disekresikan liken dalam bentuk amorf atau kristal (Zambare dan Christopher, 2012). Mayoritas metabolit sekunder yang dihasilkan liken adalah senyawa fenolat, steroid serta terpenoid. Beberapa jenis metabolit sekunder yang unik dari liken adalah depsida, depsidon, dan dibenzofuran, ketiganya termasuk dalam senyawa golongan fenolat seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.3 (Yuan, 2016).



Gambar 2. 3 Struktur umum A) Depside, B) Depsidon, dan C) Dibenzofuran

Metabolit sekunder dari liken berpotensi dalam berbagai aktivitas farmakologi. Adapun potensi bioaktivitas metabolit sekunder yang telah diteliti adalah sebagai antibakteri (Bhattarai dkk., 2013; Sisodia dkk., 2013; Dieu dkk., 2014; Yuan, 2016), antioksidan (Gulluce dkk., 2006; Bhattarai dkk., 2008; Thadhani dkk., 2011; Sisodia dkk., 2013), antikanker (Singh dkk., 2013; Aravind dkk., 2014; Nguyen dkk., 2014; Suh dkk., 2017), antiprotozoa (Fritis dkk., 2013; Igoli dkk., 2014), dan

antiproliferatif (Bucar dkk., 2004; Burlando dkk., 2009; Brisdelli dkk., 2013; Bessadóttir dkk., 2014). Berbagai penelitian mengenai aktivitas antibakteri metabolit sekunder liken dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2. 1 Berbagai penelitian aktivitas antibakteri dari metabolit sekunder liken

Liken	Metabolit Sekunder	Aktivitas
<i>Cladonia incrassata</i>	1,5-dihydroxy- 2,4,6-trichloro-7-methylxanthone, (-)-usnic acid, didymic acid, condidymic acid, squamatic acid, thamnolic acid, dan prasinic acid	Didymic acid, condidymic acid, dan (-)-usnic acid aktif terhadap <i>S. aureus</i> dengan MIC 7,5µg/mL (Dieu dkk., 2014)
<i>Evernia divaricata</i> (L.) Ach.	(+)-12 <i>R</i> -usnic acid dan divaric acid	(+)-12 <i>R</i> -usnic acid dan divaric acid teruji aktif menghambat pertumbuhan <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , dan <i>P. aeruginosa</i> (Yuan, 2016)
<i>Ramalina roesleri</i>	Asam usnat, asam 1-hidroksi-4-metoksi-6-propilbenzoat, homosekikaic acid, sekikaic acid, dan divaric acid	Senyawa diuji terhadap <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. viridochromogenes</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> . Asam usnat memiliki aktivitas antibakteri tertinggi. Seluruh senyawa memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram negatif yang diuji (Sisodia dkk., 2013)
<i>Stereocaulon alpinum</i>	Lobastin dan lobaric acid	Senyawa teruji aktif terhadap <i>B. subtilis</i> dan <i>S. aureus</i> , namun tidak aktif terhadap <i>C. albicans</i> dan <i>A. niger</i> (Bhattarai dkk., 2013)
<i>Ramalina terebrata</i>	Asam usnat, Usimine A, Usimine B, Usimine C dan Ramalin	Sampel diuji pada bakteri <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> . Baik ekstrak dan senyawa dari <i>Ramalina terebrata</i> menunjukkan aktivitas antibakteri dengan MIC tertinggi 1,2 µg/ml (Paudel dkk., 2010)
<i>Cladia aggregata</i>	Asam barbatat	Senyawa diuji pada <i>multi drug-resistant S. aureus</i> dan dapat menghambat berbagai strain bakteri uji dengan nilai MIC 50 µg/mL, kecuali pada strain resisten hanya memiliki nilai MIC sebesar 100 µg/mL (Martins dkk., 2010)

2.4 Ekstraksi dan Fraksinasi

2.4.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan senyawa kimia dari tumbuhan ataupun hewan (Mandal dkk., 2015). Proses ekstraksi akan menghasilkan ekstrak. Pada dasarnya ekstrak merupakan sediaan kental yang didapat dari proses ekstraksi dengan pelarut yang sesuai, kemudian pelarut diuapkan (Depkes RI, 2000). Metode ekstraksi yang umum digunakan untuk ekstraksi bahan alam di antaranya adalah dengan menggunakan pelarut, yaitu dengan metode maserasi, perkolasi, refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok.

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang cenderung dipilih dalam penelitian ini karena paling sederhana dan ekonomis. Ekstraksi dengan metode ini dilakukan pada suhu kamar (27°C) sehingga tidak menyebabkan rusaknya senyawa yang tidak tahan panas. Simplisia direndam menggunakan pelarut tertentu dalam wadah tertutup, dengan beberapa kali pengadukan (Depkes RI, 2000). Pelarut akan masuk ke dalam sel simplisia secara difusi dan melarutkan metabolit ke luar sel sehingga membuat pelarut menjadi jenuh akan metabolit. Pengadukan akan membantu proses ekstraksi dengan cara meningkatkan difusi pelarut, serta membantu perpindahan antara pelarut yang sudah jenuh di permukaan sel dengan pelarut yang belum jenuh akan metabolit (Azmir dkk., 2013).

2.4.2 Fraksinasi

Fraksinasi ekstrak merupakan proses yang dilakukan untuk memisahkan senyawa yang dikandung ekstrak sesuai sifat fisiko-kimia. Sifat kelarutan hingga kepolaran senyawa dapat mempengaruhi fraksinasi sesuai metode yang dipilih. Fraksinasi secara umum dapat dilakukan dengan metode partisi cair-cair, pengendapan, destilasi, dan kromatografi (Houghton dan Raman, 2012).

Partisi cair-cair dilakukan dengan menambahkan cairan dalam ekstrak yang telah dilarutkan dalam cairan lain yang tidak bercampur sehingga membentuk dua

fase. Senyawa dalam ekstrak akan melarut di antara dua fase tersebut sesuai polaritasnya. Metode ini mengaplikasikan prinsip *like dissolve like*, yakni kelarutan senyawa antar dua fase akan tergantung kemiripan antara polaritas senyawa dengan cairan pelarut (Houghton dan Raman, 2012). Metode partisi cair-cair cenderung dipilih pada penelitian karena merupakan metode yang sederhana dan ekonomis, sehingga mudah untuk dilakukan (Pereira dkk., 2013).

2.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan metode yang dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang dikandung pada sampel yang diteliti. Metode ini tergolong sederhana, cepat, dan mampu menegaskan golongan senyawa atau senyawa aktif yang ada dalam sampel (Puspitasari dkk., 2013). Skrining fitokimia dapat dilakukan dengan uji tabung atau dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada penelitian ini, skrining fitokimia dilakukan dengan KLT. Keuntungan skrining fitokimia dengan KLT adalah penggunaan sampel yang sedikit dan lebih sensitif dibandingkan uji tabung. Golongan senyawa yang dideteksi dengan uji KLT pada penelitian antara lain alkaloid (dengan reagen Dragendorff), antrakinon (dengan reagen KOH 10% dalam metanol), senyawa fenolat (dengan reagen FeCl_3) (Evans dan Trease, 2009), flavonoid (dengan uap amonia), sapogenin steroid atau triterpenoid, serta steroid dan terpenoid bebas (dengan reagen anisaldehyd asam sulfat) (Harbone, 2006).

2.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dapat menjadi langkah awal dalam penelitian dan pengembangan senyawa antibakteri. Pengujian ini dapat dilakukan untuk skrining potensi atau kuantifikasi aktivitas antibakteri dari sampel yang diteliti. Beberapa metode yang paling sering digunakan dalam uji aktivitas antibakteri antara lain adalah metode difusi dan dilusi (Balouiri dkk., 2016).

Uji aktivitas antibakteri metode dilusi dapat dilakukan untuk kuantifikasi aktivitas antibakteri dari senyawa senyawa yang diuji. Dilusi dapat dilakukan pada media agar atau media cair. Metode dilusi yang terstandar menurut *Clinical and Laboratory Standards Institute* adalah metode dilusi agar, makrodilusi dengan media cair, dan mikrodilusi dengan media cair (CLSI, 2015). Mikrodilusi memiliki keuntungan berupa penggunaan sampel yang tidak terlalu banyak, sehingga lebih ekonomis. Pada metode ini senyawa uji diencerkan dua kali lipat sehingga menghasilkan seri konsentrasi tertentu (misalnya 512 $\mu\text{g/mL}$, 256 $\mu\text{g/mL}$, 128 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$), kemudian dimasukkan ke dalam sumuran pada *microplate 96-well*. Bakteri uji kemudian diencerkan sesuai standar Mc Farland 0,5 dan diinokulasi pada sumuran. Setelah dihomogenkan, *microplate* diinkubasi dengan kondisi yang sesuai dan penghambatan pertumbuhan bakteri diukur (Balouiri dkk., 2016).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

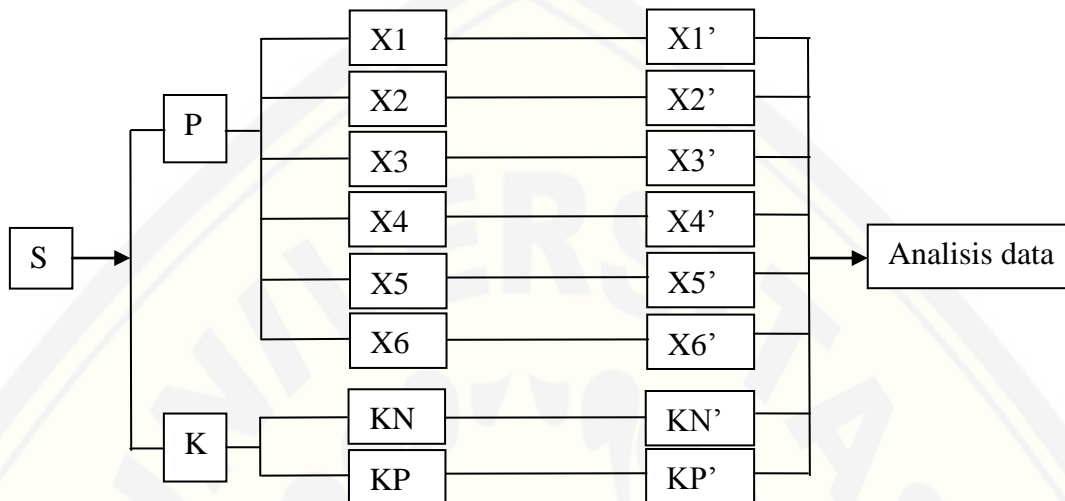
Skринing Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Epifit Liken *Parmelia cetrata* Ach. terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ini merupakan penelitian *true experiment*.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test control only group design*. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode mikrodilusi. Penelitian terbagi atas kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan akan diukur absorbansinya dan ditentukan nilai IC_{50} . Rancangan penelitian uji aktivitas antibakteri ditunjukkan pada Gambar 3.1.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Bagian Kimia Fakultas Farmasi, Laboratorium Divisi Nutrasetikal dan Farmasetikal *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember, dan Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember mulai bulan Oktober 2017 hingga Juni 2018.



Gambar 3. 1 Skema rancangan penelitian uji antibakteri metode mikrodilusi

Keterangan:

S = sampel

P = perlakuan

K = kontrol

X₁₋₆ = kelompok perlakuan dengan berbagai konsentrasi sampel

KN = kontrol negatif

KP = kontrol positif

X₁₋₅' = data hasil uji pada kelompok perlakuan dengan berbagai konsentrasi sampel

KN' = data hasil uji kontrol negatif

KP' = data hasil uji kontrol positif

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, ayakan mesh 100, *blender*, penyemprot reagen, *TLC chamber* (Duran), mortar, stemper, *yellow tip*, *blue tip*, eppendorf, spatula logam, cawan porselen, jarum ose,

pembakar spiritus, *rotary evaporator* (Strike 300), *orbital incubator* (Stuart SI600), *microplate flat bottom 96 wells* (Iwaki), mikropipet (Socorex dan Eppendorf), *12-channel micropipette* (Socorex), *Laminar Air Flow* (LabGard AIR), autoklaf (TOMY ES-315), *microplate reader* (Corona SH-1000), *hot plate* (UC152), neraca analitik (ES 225SM-DR), vortex (GENIE2), corong pisah (Pyrex), cawan petri (Duran), *orbital shaker* (Stuart SSL1).

3.4.1 Bahan

Bahan yang digunakan untuk membuat simplisia dalam penelitian ini antara lain liken *P. cetrata* serta nitrogen cair. Bahan kimia yang digunakan untuk skrining fitokimia antara lain butanol, asam asetat glasial, kloroform, reagen Dragendorff, KOH, anisaldehyd asam sulfat, FeCl₃, vanilin, H₂SO₄, dan silika gel F₂₅₄(Merck). Bahan yang digunakan untuk ekstraksi dan fraksinasi adalah metanol pa (Merck), heksana (Merck), diklorometana (Merck), etil asetat (Merck). Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri antara lain DMSO (Merck), akuades demineralisasi (Hydrobatt) parafilm (M Parafilm) CaCl₂ dan MgCl₂ (Brataco),. Bakteri uji yang digunakan adalah *P. aeruginosa* ATCC 27853. Media bakteri yang digunakan antara lain *Mueller Hinton Broth* (Merck) dan *Mueller Hinton Agar* (Merck). Zat pembanding antibakteri adalah gentamisin sediaan injeksi 40 mg/mL (Indofarma).

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi sampel yang digunakan untuk uji mikrodilusi. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol, fraksi heksana, dan fraksi diklorometana liken terhadap *P. aeruginosa* dilakukan dengan konsentrasi 2048 µg/mL, 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, dan 64 µg/mL; fraksi etil asetat liken menggunakan konsentrasi 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, 128

$\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, dan 32 $\mu\text{g/mL}$; serta residu liken menggunakan konsentrasi 4096 $\mu\text{g/mL}$, 2048 $\mu\text{g/mL}$, 1024 $\mu\text{g/mL}$, 512 $\mu\text{g/mL}$, 256 $\mu\text{g/mL}$, dan 128 $\mu\text{g/mL}$.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi adalah nilai IC_{50} sampel uji terhadap *P. aeruginosa* pada media *Cation Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB) setelah inkubasi 20 jam pada suhu 37°C.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah pembuatan simplisia liken *P. cetrata*, metode ekstraksi maserasi, metode fraksinasi partisi cair-cair, media MHA dan CAMHB, biakan bakteri, kondisi inkubasi, serta cara pengukuran hasil uji aktivitas antibakteri.

3.6 Definisi Operasional

Berikut adalah definisi operasional dari penelitian ini:

- a. Tumbuhan epifit liken (*P. cetrata*) yang dipakai pada penelitian ini adalah seluruh bagian tumbuhan. Liken memiliki bentuk morfologi foliose dengan bagian atas berwarna hijau abu-abu dan dikumpulkan secara acak saat musim hujan di Klocing, Bondowoso.
- b. Metode yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak metanol liken *P. cetrata* adalah ekstraksi maserasi. Metode yang digunakan untuk mendapatkan fraksi heksana, diklorometana, etil asetat, serta residu dari liken *P. cetrata* adalah dengan partisi cair-cair menggunakan corong pisah.
- c. Golongan senyawa yang diuji pada skrining fitokimia ekstrak metanol liken *P. cetrata* adalah alkaloid, antrakinon, flavonoid, fenolat, sapogenin steroid atau triterpenoid, serta terpenoid atau steroid bebas. Golongan senyawa yang

diuji pada skrining fitokimia fraksi liken *P. cetrata* adalah antrakinon, flavonoid, fenolat, serta terpenoid atau steroid bebas.

- d. Bakteri yang digunakan sebagai bakteri uji adalah bakteri gram negatif *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Determinasi Tumbuhan Epifit Liken

Sampel tumbuhan epifit liken yang diambil di Bondowoso dikirim ke Ludmilla Fitri Untari, S.Si., M.Si. (*lichenologist*) di Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada (UGM) Yogyakarta untuk determinasi nama spesies.

3.7.2 Pembuatan Simplisia dan Serbuk Liken *P. cetrata*

Liken dikumpulkan dan dilakukan sortasi basah, kemudian dicuci dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat yang terhindar sinar matahari langsung. Liken kemudian disortasi kembali (sortasi kering). Simplisia liken yang didapatkan selanjutnya dikecilkan ukurannya dengan bantuan *blender* dan digerus hingga menjadi serbuk menggunakan nitrogen cair. Serbuk liken kemudian diayak agar ukurannya seragam menggunakan ayakan mesh 100.

3.7.3 Pembuatan Ekstrak Metanol Liken *P. cetrata*

Serbuk liken *P. cetrata* dimasukkan ke dalam erlenmeyer tertutup dan ditambahkan pelarut metanol pro analisis dengan perbandingan 1:10 (b/v). Ekstraksi dilakukan dengan bantuan *orbital shaker*. Hasil ekstraksi disaring dan dikumpulkan filtratnya, kemudian residunya diremaserasi. Filtrat yang terkumpul dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Ekstrak pekat kemudian diletakkan dalam vial dan dimasukkan ke dalam oven suhu 40°C untuk mendapatkan ekstrak kental

atau ekstrak kering. Ekstrak kental atau ekstrak kering yang diperoleh dihitung rendemennya.

3.7.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan secara kualitatif dengan lempeng kromatografi lapis tipis (KLT).

a. Identifikasi Senyawa Golongan Alkaloid

Ekstrak kering sebanyak 0,1 gram ditambahkan dengan HCl 2N sebanyak 1,7 mL kemudian dipanaskan selama 3 menit sambil diaduk. Sampel kemudian didinginkan dan selanjutnya ditambah 0,1 gram NaCl sambil diaduk. Sampel selanjutnya disaring dan filtratnya ditambah HCl 2N sebanyak 1,7 mL. Setelah itu sampel ditotolkan pada lempeng KLT dan dieluasi dengan fase gerak etil asetat–metanol–air (9:2:2). Penampak noda yang digunakan adalah Dragendorff. Timbulnya warna jingga menjadi indikasi adanya alkaloid dalam sampel.

b. Identifikasi Senyawa Golongan Antrakinon

Ekstrak atau fraksi sebanyak 0,1 gram diekstraksi dengan menggunakan 3,3 mL air suling dan disaring. Selanjutnya filtrat diekstraksi dengan 1 mL toluena. Ekstraksi ini dilakukan hingga dua kali, kemudian fase toluena dikumpulkan. Fase toluena yang didapatkan kemudian ditotolkan pada lempeng KLT dan dieluasi menggunakan fase gerak toluena–etil asetat–asam asetat (75:24:1). Penampak noda yang digunakan adalah larutan 10% KOH dalam metanol. Adanya antrakinon pada sampel ditunjukkan dengan timbulnya noda warna kuning, kuning coklat, merah ungu, atau hijau ungu.

c. Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid

Ekstrak atau fraksi sebanyak 50 mg ditimbang dan dilarutkan dengan metanol, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT dan dieluasi. Fase gerak yang digunakan dalam identifikasi flavonoid adalah butanol–asam asetat glasial–air (4:1:5). Pada pembuatan fase gerak akan terbentuk 2 lapisan. Lapisan yang digunakan untuk eluasi

lempeng KLT adalah lapisan bagian atas. Lempeng KLT yang telah dieluasi selanjutnya dikeringkan dan diberi uap amonia sebagai penampak noda. Timbulnya warna kuning menjadi indikasi adanya flavonoid.

d. Identifikasi Senyawa Fenolat

Ekstrak atau fraksi sebanyak 50 mg ditimbang dan dilarutkan dengan metanol. Ekstrak atau fraksi tersebut kemudian ditotolkan pada lempeng KLT dan dieluasi. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform–etil asetat (1:9). Penampak noda yang digunakan adalah FeCl_3 . Lempeng KLT yang telah dieluasi selanjutnya dikeringkan dan disemprot reagen, kemudian dipanaskan selama 1-2 menit. Timbulnya warna hitam menjadi indikasi adanya senyawa polifenol.

e. Identifikasi Sapogenin Triterpenoid atau Sapogenin Steroid

Ekstrak kering sejumlah 0,5 gram ditambahkan dengan 5 mL HCl 2N, kemudian dididihkan serta ditutup menggunakan corong bersisi kapas basah selama 2 jam. Hal ini dilakukan untuk hidrolisis saponin. Setelah sampel dingin maka dinetralkan dengan menggunakan amonia, dan selanjutnya diekstraksi dengan n-heksana 3 mL sebanyak 3 kali. Sampel kemudian diupakan hingga tersisa kira-kira 0,5 mL. Sampel selanjutnya ditotolkan pada lempeng KLT dan dieluasi dengan fase gerak berupa n-heksanal–etil asetat (4:1). Lempeng KLT yang selesai dieluasi selanjutnya disemprot dengan penampak noda anisaldehyda asam sulfat dan dipanaskan selama 1-2 menit. Hasil positif sapogenin triterpenoid atau sapogenin steroid ditunjukkan dengan adanya noda warna merah ungu atau ungu pada lempeng KLT.

f. Identifikasi Terpenoid atau Steroid Bebas

Ekstrak atau fraksi sejumlah 50 mg dilarutkan dalam metanol, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT. Lempeng KLT tersebut kemudian dieluasi dengan fase gerak heksana–etil asetat (4:1). Penampak noda yang digunakan adalah anisaldehyd asam sulfat. Lempeng KLT yang telah dieluasi kemudian dikeringkan dan disemprot dengan reagen, kemudian dipanaskan selama 1-2 menit. Timbulnya warna

merah ungu atau ungu menjadi indikasi adanya terpenoid atau steroid bebas dalam ekstrak atau fraksi yang diuji.

3.7.5 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode mikrodilusi. Pengujian dilakukan sesuai dengan protokol yang ditetapkan oleh *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)*.

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat gelas, *yellow tip*, *blue tip*, dan media yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri disterilisasi dengan autoklaf. Alat yang disterilisasi terlebih dahulu dicuci, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas kayu. Sterilisasi dilakukan dengan suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Jarum ose disterilisasi dengan pemijaran.

b. Penyiapan Media

1) Penyiapan Media MHA

Pembuatan media padat *Mueller-Hinton Agar (MHA)* digunakan untuk peremajaan bakteri uji. Media dibuat dengan melarutkan 1,6 gram MHA dalam 80 mL akuades demineralisasi. Media kemudian disterilisasi dengan autoklaf suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Media yang telah disterilisasi kemudian dituang dalam 4 cawan petri steril dengan volume masing-masing 20 mL dan ditunggu hingga memadat, kemudian disegel dengan parafilm.

2) Penyiapan Media CAMHB

Pembuatan media cair CAMHB digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi. Media CAMHB dibuat dari *Mueller Hinton Broth (MHB)* yang ditambah dengan $MgCl_2$ dan $CaCl_2$. Media MHB dibuat dengan melarutkan 3,15 gram MHB dalam 50 mL akuades demineralisasi. Media kemudian disterilisasi dengan autoklaf suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit.

Media MHB yang telah disterilisasi kemudian ditambahkan $MgCl_2$ dan $CaCl_2$ hingga konsentrasi Mg^{2+} 11,25 mg/L dan konsentrasi Ca^{2+} adalah 22,5 mg/L (CLSI,

2015a). Larutan induk $MgCl_2$ dibuat dengan melarutkan 835,39 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ dalam 10 mL akuades demineralisasi sehingga didapat konsentrasi 10 mg Mg^{2+}/mL . Larutan induk $CaCl_2$ dibuat dengan melarutkan 366,81 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ dalam 10 mL akuades demineralisasi sehingga didapat kadar 10 mg Ca^{2+}/mL . Pada 150 mL media MHB yang telah disterilisasi, ditambahkan larutan induk $MgCl_2$ sebanyak 0,169 mL serta larutan induk $CaCl_2$ sebanyak 0,338 mL sehingga didapatkan konsentrasi 11,25 mg Mg^{2+}/L dan 22,5 mg Ca^{2+}/L .

c. Peremajaan Biakan Murni

Biakan murni diremajakan pada media MHA di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) secara aseptis. Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara menggoreskan jarum ose yang mengandung *P. aeruginosa* ke media padat. Cawan petri selanjutnya ditutup rapat dengan parafilm dan diinkubasi dengan inkubator pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam.

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pada uji aktivitas antibakteri metode mikrodilusi, bakteri uji *P. aeruginosa* dari kultur peremajaan biakan murni diambil sebanyak 2-3 koloni dengan ose secara aseptis dan disuspensikan secara homogen dalam media CAMHB. Biakan tersebut kemudian disesuaikan kekeruhannya dengan Mc Farland 0,5 menggunakan bantuan spektrofotometer. Absorbansi yang ditargetkan adalah 0,08-0,13 menggunakan panjang gelombang 625 nm (CLSI, 2015a). Biakan kemudian diencerkan hingga 100 kali dari konsentrasi awal sehingga didapat suspensi 1×10^6 CFU/mL sebagai biakan aktif.

e. Pembuatan Kontrol Negatif dan Kontrol Positif

1) Kontrol Negatif

Kontrol negatif untuk uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi yang digunakan adalah DMSO 1% dalam media CAMHB.

2) Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan adalah gentamisin sediaan injeksi 40 mg/mL yang diencerkan dengan CAMHB menjadi 200 µg/mL sebagai larutan induk. Larutan induk kemudian diencerkan menjadi 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, dan 0,5 µg/mL.

f. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dengan melarutkan sampel menggunakan DMSO 1% dalam media CAMHB. Sampel diencerkan menjadi 6 konsentrasi yaitu 2048 µg/mL, 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, dan 64 µg/mL untuk ekstrak metanol, fraksi heksana, dan fraksi diklorometana; 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, dan 32 µg/mL untuk fraksi etil asetat; serta 4096 µg/mL, 2048 µg/mL, 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, dan 128 µg/mL untuk residu.

g. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Mikrodilusi

Preparasi untuk uji aktivitas antibakteri dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Media CAMHB sebanyak 50 µL, biakan aktif bakteri (dalam media CAMHB) sebanyak 50 µL, kontrol negatif DMSO 1% sebanyak 50 µL, kontrol positif gentamisin sebanyak 50 µL, serta ekstrak atau fraksi liken *P. cetrata* tiap konsentrasi sebanyak 50 µL dimasukkan ke dalam *microplate-96-well* sebanyak tiga kali replikasi sesuai dengan pemetaan pada Gambar 3.2. Volume akhir tiap sumuran adalah 100 µL. *Microplate* diinkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C. Data hasil pengujian didapat dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 625 nm menggunakan *microplate reader*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Light Green	Light Green	Light Green	Light Blue		Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Blue		
C		Light Green	Light Green	Light Green	Light Blue		Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Blue		
D		Light Green	Light Green	Light Green	Light Blue		Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Blue		
E		Light Green	Light Green	Light Green	Pink		Dark Green	Dark Green	Dark Green	Purple		
F		Light Green	Light Green	Light Green	Pink		Dark Green	Dark Green	Dark Green	Purple		
G		Light Green	Light Green	Light Green	Pink		Dark Green	Dark Green	Dark Green	Purple		
H												

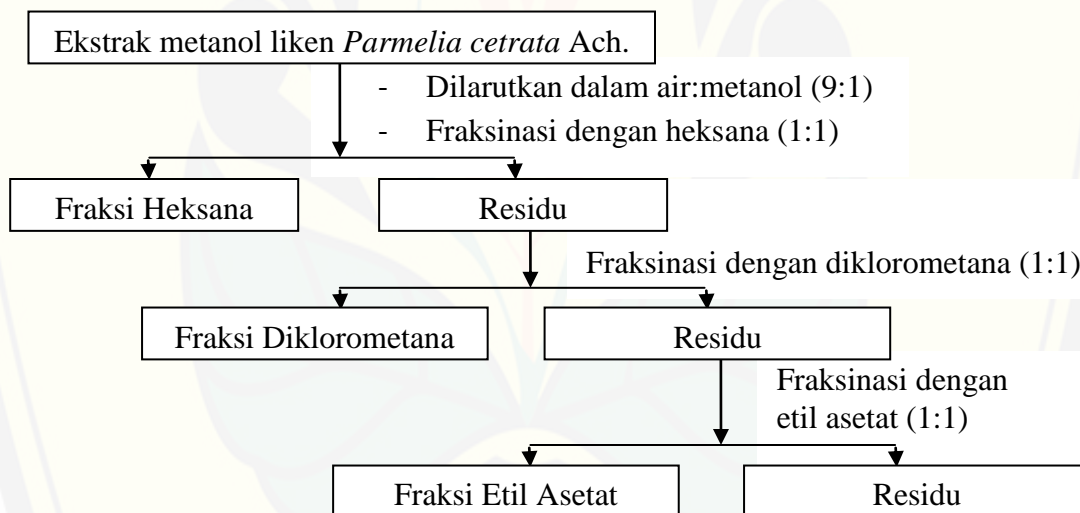
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange					
C		Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange					
D		Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange					
E		Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange					
F		Pink	Pink	Pink	Purple	Purple	Purple					
G												
H												

Gambar 3. 2 Pemetaan mikrodilusi pada *microplate-96-well*

- = sampel + bakteri dalam media CAMHB
- = sampel + media CAMHB
- = gentamisin + bakteri dalam media CAMHB
- = gentamisin + media CAMHB
- = DMSO 1% + bakteri dalam media CAMHB
- = DMSO 1% + media CAMHB
- = media CAMHB + bakteri dalam media CAMHB
- = media CAMHB

3.7.6 Pembuatan Fraksi Liken *P. cetrata*

Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi cair-cair secara bertingkat yang ditunjukkan pada Gambar 3.3. Ekstrak kering dilarutkan dalam air dan sedikit metanol, kemudian dipartisi dengan heksana. Fraksi heksana yang didapat kemudian dipisahkan dan dipekatkan. Fraksinasi dilanjutkan dengan diklorometana. Fraksi diklorometana yang didapat kemudian dipisahkan dan dipekatkan. Fraksinasi dilanjutkan dengan etil asetat. Fraksi etil asetat kemudian dipisahkan dari residu dan masing-masing fraksi dipekatkan. Berdasarkan proses tersebut maka didapatkan fraksi heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat, dan residu. Fraksi yang diperoleh kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri untuk mengetahui fraksi yang paling aktif.



Gambar 3. 3 Skema alur fraksinasi bertingkat Liken *Parmelia cetrata* Ach.

3.8 Analisis Data

Pada penelitian ini, uji skrining fitokimia akan menghasilkan data berupa perubahan warna yang sesuai kandungan pada ekstrak atau fraksi yang diuji. Uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi akan menghasilkan data absorbansi.

Tingkat penghambatan bakteri berdasarkan data hasil uji aktivitas antibakteri metode mikrodilusi dapat dihitung dengan Rumus 3.1. Setelah didapatkan data tingkat penghambatan pertumbuhan bakteri (% penghambatan) maka dilakukan analisis probit untuk mengetahui nilai IC_{50} .

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(\text{Abs.R} - \text{Abs.S})}{(\text{Abs.P} - \text{Abs.Q})} \right) \times 100 \% \dots\dots\dots (3.1)$$

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

Keterangan:

Abs = absorbansi

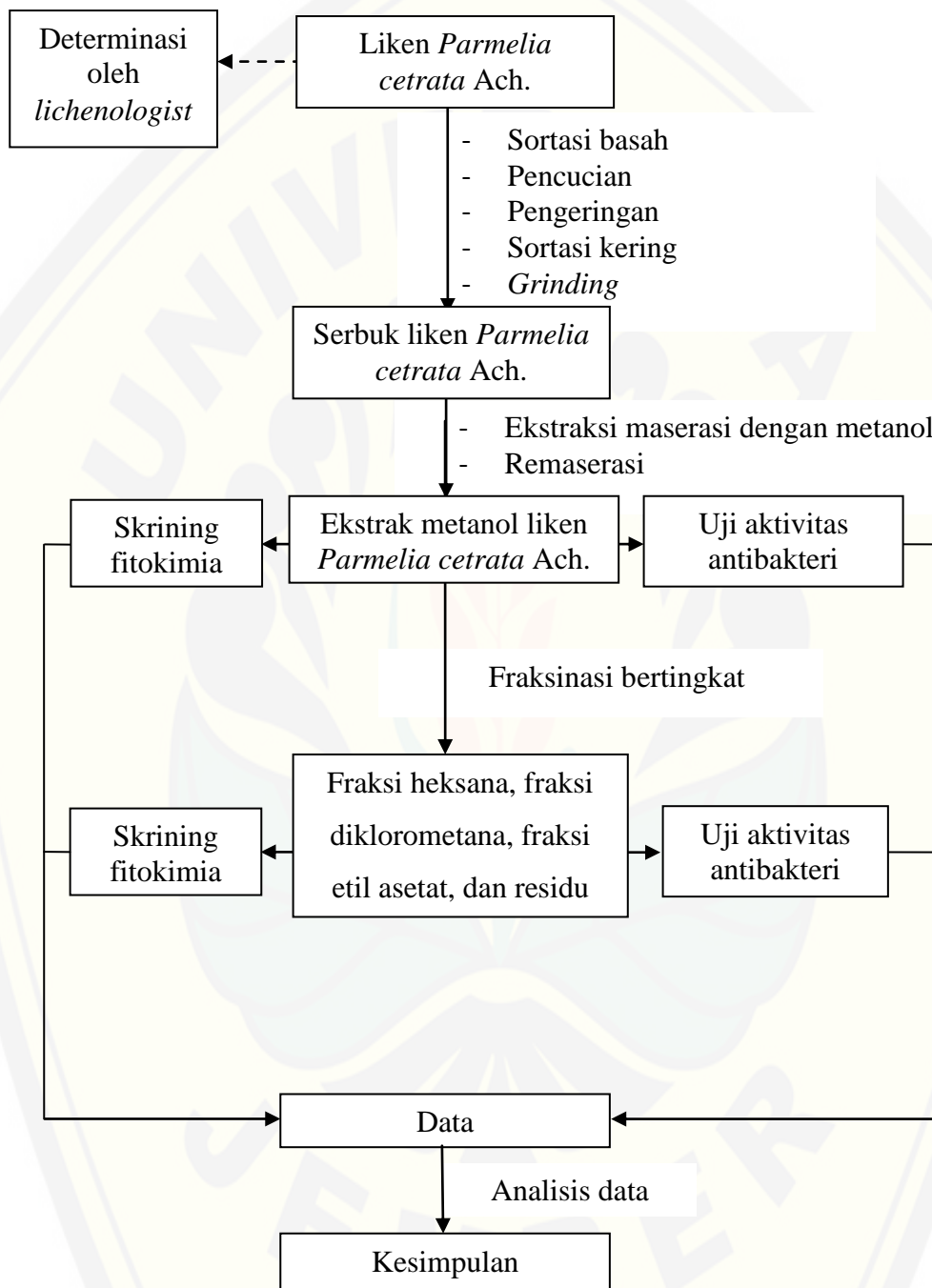
P = kontrol negatif (DMSO 1% atau media + suspensi bakteri)

Q = kontrol media (DMSO 1% atau media)

R = uji (ekstrak/fraksi/gentamisin + suspensi bakteri)

S = kontrol uji (ekstrak/fraksi/gentamisin + media)

3.9 Skema Penelitian



Gambar 3. 4 Skema penelitian secara keseluruhan

BAB 5. PENUTUP

5.2 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, kesimpulan yang dapat ditarik adalah:

1. Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol liken *P. cetrata* menunjukkan bahwa ekstrak metanol liken mengandung senyawa antrakinon, flavonoid, polifenol, terpenoid bebas atau steroid bebas. Hasil skrining fitokimia fraksi liken *P. cetrata* menunjukkan bahwa fraksi heksana liken mengandung senyawa antrakinon serta terpenoid bebas atau steroid bebas; fraksi diklorometana liken mengandung antrakinon, flavonoid, dan senyawa fenolat; fraksi etil asetat liken mengandung senyawa fenolat; dan residu liken tidak mengandung senyawa fitokimia yang diuji.
2. Nilai IC_{50} ekstrak metanol liken yang diuji adalah $1334,248 \pm 33,167 \mu\text{g/mL}$, nilai IC_{50} fraksi heksana liken adalah $1171,547 \pm 27,083 \mu\text{g/mL}$, nilai IC_{50} fraksi diklorometana liken adalah $1047,168 \pm 28,018 \mu\text{g/mL}$, nilai IC_{50} fraksi etil asetat adalah $946,621 \pm 26,393 \mu\text{g/mL}$, dan nilai IC_{50} residu liken adalah $2407,381 \pm 204,414 \mu\text{g/mL}$.

5.3 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai:

1. Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi liken *P. cetrata* terhadap bakteri lain khususnya terhadap bakteri gram positif, misalnya seperti penelitian yang pernah ada yakni liken *Parmelia saxatilis* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* dengan nilai MIC $15,62 \mu\text{g/mL}$.
2. Uji bioaktivitas lain dari liken seperti uji aktivitas antioksidan dan antikanker liken *P. cetrata* secara *in vitro* karena selain sebagai antibakteri, liken juga banyak diteliti sebagai antioksidan dan antikanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexandraki, I. dan C. Palacio. 2010. Gram-negative versus gram-positive bacteremia: what is more alarmin(g)? *Critical Care*. 14(3).
- Aravind, S. R., T. T. Sreelekha, B. S. Dileep Kumar, S. N. Kumar, dan C. Mohandas. 2014. Characterization of three depside compounds from a western ghat lichen *Parmelia erumpens* kurok with special reference to antimicrobial and anticancer activity. *RSC Advances*. 4(65):34632–34643.
- Ardani, M., S. U. P. Tunjung, dan T. Hertiani. 2010. Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai antiplak gigi. *Majalah Farmasi Indonesia*. 21(213):191–201.
- Atalay, F., M. B. Halici, A. Mavi, A. Cakir, F. Odabaşoğlu, C. Kazaz, A. Aslan, dan Ö. I. Küfrevioğlu. 2011. Antioxidant phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) hoffm. and *Usnea longissima* Ach. lichen species. *Turkish Journal of Chemistry*. 35(4):647–661.
- Azmir, J., I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, dan A. K. M. Omar. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*. 117(4):426–436.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2013. *Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013*. Jakarta.
- 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.
- Basch, H. dan H. H. Gadebusch. 1968. In vitro antimicrobial activity of dimethylsulfoxide. *Applied Microbiology*. 16(12):1953–1954.
- Bessadóttir, M., E. Skúladóttir, S. Gowan, S. Eccles, S. Ómarsdóttir, dan H. M. Ögmundsdóttir. 2014. Effects of anti-proliferative lichen metabolite, protolichesterinic acid on fatty acid synthase, cell signalling and drug response in breast cancer cells. *Phytomedicine*. 21(12):1717–1724.
- Bhatarai, H. D., T. Kim, H. Oh, dan J. H. Yim. 2013. A new pseudodepsidone from the antarctic lichen *Stereocaulon alpinum* and its antioxidant, antibacterial activity. *Journal of Antibiotics*. 66(9):559–561.

- Bhattacharai, H. D., B. Paudel, S. G. Hong, H. K. Lee, dan J. H. Yim. 2008. Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents of lichens from antarctica. *Journal of Natural Medicines*. 62(4):481–484.
- Brisdelli, F., M. Perilli, D. Sellitri, M. Piovano, J. A. Garbarino, M. Nicoletti, A. Bozzi, G. Amicosante, dan G. Celenza. 2013. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phytotherapy Research*. 27(3):431–437.
- Bucar, F., I. Schneider, H. Ögmundsdóttir, dan K. Ingólfssdóttir. 2004. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(s)-hete production in human platelets. *Phytomedicine*. 11(7–8):602–606.
- Burkholder, P. R., A. W. Evans, I. McVeigh, dan H. K. Thornton. 1944. Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 30(9):250–255.
- Burlando, B., E. Ranzato, A. Volante, G. Appendino, F. Pollastro, dan L. Verotta. 2009. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Medica*. 75(6):607–613.
- Candan, M., M. Yılmaz, T. Tay, M. Erdem, dan A. Ö. Türk. 2007. Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Parmelia sulcata* and its salazinic acid constituent. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*. (112):10–13.
- CLSI. 2015a. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition (M07-A10)*. Edisi 10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. 2015b. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition (M02-A12)*. Edisi 12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 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.
- Dayan, F. E. dan J. G. Romagni. 2001. Lichen as a potential source of pesticides. *The Royal Society of Chemistry*.
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta.
- Desbenoit, B., E. Galin, dan S. Akkouche. 2004. Simulating and modeling lichen growth. *Eurographics*. 23(3).

- Dieu, A., M. Millot, Y. Champavier, L. Mambu, V. Chaleix, V. Sol, dan V. Gloaguen. 2014. Uncommon chlorinated xanthone and other antibacterial compounds from the lichen *Cladonia incrassata*. *Planta Medica*. 80(11):931–935.
- Drews, J. 2000. Drug discovery: a historical perspective. *Science*. 287(5460):1960–1964.
- Elix, J. . A. dan E. Stocker-Worgotter. 2008. *Biochemistry and Secondary Metabolites*. Dalam Lichen Biology. Editor T. H. N. III. Cambridge: Cambridge University Press.
- Environmental & Public Health Consultants. 2018. *Pseudomonas aeruginosa* - Information and Epidemiology Services. <http://www.ehagroup.com/resources/pathogens/pseudomonas-aeruginosa/> [Diakses pada 17 Juli 2018].
- Ernst, D., R. Application, dan S. Within. 2016. *Cryogenic Preparation of Sample Materials*. Haan.
- Esimone, C. O., K. C. Ofokansi, M. U. Adikwu, E. C. Ibezim, D. O. Abonyi, G. N. Odaibo, dan D. O. Olaleye. 2007. In vitro evaluation of the antiviral activity of extracts from the lichen *Parmelia perlata* (L.) Ach. against three rna viruses. *Journal of Infection in Developing Countries*. 1(3):315–320.
- Evans, W. C. dan G. Trease. 2009. *Trease & Evans' Pharmacognosy*. Edisi 16th. Philadelphia: Saunders Ltd.
- Friedrich, M. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Infections Clinical Presentation. <https://emedicine.medscape.com/article/226748-clinical> [Diakses pada Januari 18, 2018].
- Fritis, M. C., C. R. Lagos, N. Q. Sobarzo, I. M. Venegas, C. S. Sánchez, H. C. Altamirano, L. E. Catalán, dan W. Q. Palma. 2013. Depsides and triterpenes in *Pseudocyphellaria coriifolia* (lichens) and biological activity against *Trypanosoma cruzi*. *Natural Product Research*. 27(17):1607–1610.
- Ge, B., F. Wang, M. Sjölund-karlsson, dan P. F. Mcdermott. 2013. Antimicrobial resistance in campylobacter: susceptibility testing methods and resistance trends. *Journal of Microbiological Methods*. 95(1):57–67.
- Gulluce, M., A. Aslan, M. Sokmen, F. Sahin, A. Adiguzel, G. Agar, dan A. Sokmen. 2006. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina*

- polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine*. 13(7):515–521.
- Hale, M. E. 1957. Corticolous lichen flora of the ozark mountains. *Transactions of the Kansas Academy of Science*. 60(2):155–160.
- Hancock, R. E. W. dan D. P. Speert. 2000. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates*. 3(4):247–255.
- Harbone, J. B. 2006. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Edisi 2. Bandung: Penerbit ITB.
- Hock, B. 2009. *The Symbiotic Phenotype of Lichen-Forming Ascomycetes and Their Endo- and Epibionts*. Dalam *The Mycota IX*. Editor H. B. Deising. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Houghton, P. J. dan A. Raman. 2012. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Springer.
- Igoli, J., A. Gray, C. Clements, P. Kantheti, dan R. Singla. 2014. Antitrypanosomal activity & docking studies of isolated constituents from the lichen *Cetraria islandica*: possibly multifunctional scaffolds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 14(8):1014–1021.
- Irving, W., D. Ala'Aldeen, dan T. Boswell. 2005. *Medical Microbiology*. Nottingham: Taylor & Francis Group. *Biochemistry*.
- Ismed, F., F. L. Le Dévéhat, I. Rouaud, S. Ferron, A. Bakhtiar, dan J. Boustie. 2017. NMR reassignment of stictic acid isolated from a sumatran lichen *Stereocaulon montagneanum* (Stereocaulaceae) with superoxide anion scavenging activities. *Zeitschrift Fur Naturforschung C, Verlag Der Zeitschrift Fuer Naturforschung*. 72(1–2):55–62.
- Ismed, F., S. Hartati, R. Mulyadi, H. E. Putra, N. P. Vidian, dan D. P. Putra. 2016. Isolasi senyawa depside-depsodone dari lichen sumatera (*Stereocaulon halei*) dan uji aktivitas antimikroba serta anti tuberkulosis. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 14(1):49–56.
- Kolarević, S., D. Milovanović, M. Avdović, M. Oalde, J. Kostić, K. Sunjog, B. Nikolić, J. Knežević-Vukcević, dan B. Vuković-Gaćić. 2016. Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. *Botanica Serbica*. 40(1):29–36.
- Kominos, S. D., C. A. Delenko, dan R. M. Lumish. 1997. Determination of minimum

inhibitory concentrations of aminoglycoside antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* using a commercial microdilution panel. 61(2001):3574.

Kosanic, M. dan B. Rankovic. 2015. *Lichen Secondary Metabolites as Potential Antibiotic Agents*. Dalam *Lichen Secondary Metabolites*. Editor B. Ranković. Cham: Springer International Publishing.

Kosanić, M., D. Šeklić, S. Marković, dan B. Ranković. 2014. Evaluation of antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of selected lichens from Serbia. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 9(1):273–287.

Lohezic-Le Devehat, F., S. Tomasi, J. A. Elix, A. Bernard, I. Rouaud, P. Uriac, dan J. Boustie. 2007. Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. *Journal of Natural Products*. 70(7):1218–1220.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, D. A. Stahl, dan T. Brock. 2015. *Brock Biology of Microorganisms*. Edisi 14. Pearson Education.

Mandal, S. C., V. Mandal, dan A. K. Das. 2015. *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications*. London: Elsevier Inc.

Martins, M. C. B., M. J. G. de Lima, F. P. Silva, E. Azevedo-Ximenes, N. H. da Silva, dan E. C. Pereira. 2010. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53(1):115–122.

Mishchenko, N. P., L. S. Stepanenko, O. E. Krivoshchekova, dan O. B. Maksimov. 1980. Anthraquinones of the lichen *Asahinea chrysantha*. *Chemistry of Natural Compounds*. 16(2):117–121.

Nash, T. H., B. D. Ryan, C. Gries, dan F. Bungartz. 2002. *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region Volume 1*. Tempe: Arizona State University.

Nguyen, T. T., S. Yoon, Y. Yang, H.-B. Lee, S. Oh, M.-H. Jeong, J.-J. Kim, S.-T. Yee, F. Crisan, C. Moon, K. Y. Lee, K. K. Kim, J.-S. Hur, dan H. Kim. 2014. Lichen secondary metabolites in *Flavocetraria cucullata* exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. *PLoS One*. 9(10).

Nigam, A., D. Gupta, dan A. Sharma. 2014. *Treatment of Infectious Disease: Beyond Antibiotics*. Microbiological Research. 2014.


Paudel, B., H. D. Bhattarai, H. K. Lee, H. Oh, H. W. Shin, dan J. H. Yim. 2010. Antibacterial activities of ramalin, usnic acid and its three derivatives isolated

- from the antarctic lichen *Ramalina terebrata*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. 65(1–2):34–38.
- Pereira, J., J. Gonçalves, V. Alves, dan J. S. Câmara. 2013. Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: recent applications and future trends. *Sample Preparation*. 1:38–53.
- Puspitasari, L., D. a. Swastini, dan C. I. . Arisanti. 2013. Skrining fitokimia ekstrak etanol 95% kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal Farmasi Udayana*. 961:5.
- Quave, C. L., L. R. W. Plano, T. Pantuso, dan B. C. Bennett. 2008. Effects of extracts from italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 118(3):418–428.
- Ramirez Ronda, C. H., R. K. Holmes, dan J. P. Sanford. 1975. Effects of divalent cations on binding of aminoglycoside antibiotics to human serum proteins and to bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 7(3):239–245.
- Ramya, K. dan T. Thirunalasundari. 2014. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens of Kodaikanal, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(11):779–788.
- Rankovic, B. dan M. Kosanic. 2015. *Lichen Secondary Metabolites*. Cham: Springer International Publishing. *Lichen Secondary Metabolites*.
- Rankovic, B., M. Misic, dan S. Sukdolak. 2008. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24:1239–1242.
- Roziaty, E. 2016. Kajian lichen : morfologi, habitat dan bioindikator kualitas udara ambien akibat polusi kendaraan bermotor. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*. 2(1):54–66.
- Sesal, C., G. Çobanoğlu, İ. Karaltı, dan B. Açıkgoz. 2016. In vitro antimicrobial potentials of four ramalina lichen species from Turkey. 6(3):202–209.
- Sharma, A. K., M. C. Sharma, dan M. P. Dobhal. 2012. Phytochemical investigation of therapeutic important lichen: *Parmelia perlata*. *J. Nat. Prod. Plant Resour.* 2(1):101–106.
- Shrestha, G. dan L. L. St. Clair. 2013. Lichens: A Promising Source of Antibiotic and

- Anticancer Drugs. *Phytochemistry Reviews*. 2013.
- Singh, N., D. Nambiar, R. K. Kale, dan R. P. Singh. 2013. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma a549 cells. *Nutrition and Cancer*. 65:36–43.
- Singh, S. B., K. Young, dan L. L. Silver. 2017. What is an “ideal” antibiotic? discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*. 133(January):63–73.
- Sisodia, R., M. Geol, S. Verma, A. Rani, dan P. Dureja. 2013. Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. *Natural Product Research*. 27(23):2235–2239.
- Solihin, A. 2015. Uji antihelmintik ekstrak lichen (*Usnea sp.*) terhadap cacing gelang babi (*Ascaris suum*, goeze 1782).
- Suh, S.-S., T. Kim, J. Kim, J.-M. Hong, T. Nguyen, S. Han, U. Youn, J. Yim, dan I.-C. Kim. 2017. Anticancer activity of ramalin, a secondary metabolite from the antarctic lichen *Ramalina terebrata*, against colorectal cancer cells. *Molecules*. 22(8):1361.
- Thadhani, V. M., M. I. Choudhary, S. Ali, I. Omar, H. Siddique, dan V. Karunaratne. 2011. Antioxidant activity of some lichen metabolites. *Natural Product Research*. 25(19):1827–1837.
- The Commission of The European Communities. *Requirements for the Determination of Levels of Dioxins and Dioxin-Like PCBs in Feedingstuffs Rules*. 2005.
- VetBact.org. 2015. VetBact - *Pseudomonas aeruginosa*. <http://www.vetbact.org/index.php?artid=65&vbsearchstring=Pseudomonas aeruginosa> [Diakses pada 30 Januari 2018].
- WHO. 2012. *Global Report for Research on Infectious Diseases of Poverty*. WHO.
- WHO. 2016. *Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015*. Geneva.
- WHO. 2017a. *Antibacterial Agents in Clinical Development: An Analysis of the Antibacterial Clinical Development Pipeline, Including Tuberculosis*. Geneva.
- WHO. 2017b. WHO EMRO | Infectious Diseases. <http://www.emro.who.int/health-topics/infectious-diseases/index.html> [Diakses pada 17 Januari 2018].

- Wibowo, R., Zulfikar, Paramu, H., Rato, D., Addy, H. A., Sulistyaningsih, E., Bukhori, S., Tallapessy, A., Gianawati, N. D., Siswoyo, Rijadi, A., Nawiyanto. 2016. *Pedoman Penulisan Karya Ilmiah*. Jember: UPT Penerbitan Universitas Jember.
- Wise, R. dan L. J. V. Piddock. 2010. *The Urgent Need: Regenerating Antibacterial Drug Discovery Development*.
- Yuan, C. 2016. Antibacterial compounds and other constituents of *Evernia divaricata* (L.) ach. *Journal- Chemical Society of Pakistan*. 32(2).
- Zambare, V. P. dan L. P. Christopher. 2012. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*. 50(6):778–798.
- Zhu, F., C. Qin, L. Tao, X. Liu, Z. Shi, X. Ma, J. Jia, Y. Tan, C. Cui, J. Lin, C. Tan, Y. Jiang, dan Y. Chen. 2011. Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(31):12943–12948.

LAMPIRAN

Lampiran 4.1 Hasil Determinasi Lichen *P. cetrata*

UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS BIOLOGI
LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN
Jalan Tekniko Selatan Sekeloa Utara Yogyakarta 55283, Telpun (0274) 6492262/6492272, Fax: (0274) 560839

SURAT KETERANGAN
Nomor - 01360/S.Th./VI/ 2018

Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi UGM, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa,


Nama : Nadya Dini Lestari
Asal instansi : Fakultas Farmasi Universitas Jember

telah melakukan identifikasi lichen dengan hasil sebagai berikut,

Divisi : Ascomycota
Class : Lecanoromycetes
Ordo : Lecanorales
Familia : Parmeliaceae
Genus : Parmelia
Species : *Parmelia cetrata* Ach

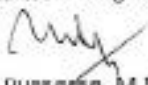
Identifikasi tersebut dibantu oleh Ludmilla Fitri Untari, S.Si., M.Si.
Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Mengetahui,
Dekan Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada



Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr.Sc.
NIP. 197003261995121001

Yogyakarta, 4 Juni 2018
Kepala Laboratorium
Sistematika Tumbuhan
Fakultas Biologi UGM



Dr. Purnomo, M.S.
NIP. 195504211982031005

Lampiran 4.2 Perhitungan Rendemen Ekstrak Metanol, Fraksi Heksana, Fraksi Diklorometana, Fraksi Etil Asetat dan Residu Liken *P. cetrata***1. Rendemen Ekstrak Metanol**

Berat serbuk kering liken	= 42,91 gram
Berat wadah + ekstrak kering	= 19,11 gram
Berat wadah kosong	= 12,43 gram
Ekstrak kering	= 6,68 gram
Rendemen ekstrak etanol	$= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Berat serbuk awal}} \times 100\%$ $= \frac{6,68 \text{ gram}}{42,91 \text{ gram}} \times 100\%$ $= 15,57\%$

2. Rendemen Fraksi Heksana

Berat ekstrak untuk fraksinasi	= 4,00 gram
Berat wadah + fraksi heksana	= 10,96 gram
Berat wadah kosong	= 10,36 gram
Fraksi heksana	= 0,60 gram
Rendemen fraksi heksana	$= \frac{\text{Berat fraksi}}{\text{Berat ekstrak untuk fraksinasi}} \times 100\%$ $= \frac{0,60 \text{ gram}}{4,00 \text{ gram}} \times 100\%$ $= 15,00\%$

3. Rendemen Fraksi Diklorometana

Berat ekstrak untuk fraksinasi	= 4,00 gram
Berat wadah + fraksi diklorometana	= 10,90 gram
Berat wadah kosong	= 10,35 gram
Fraksi diklorometana	= 0,55 gram

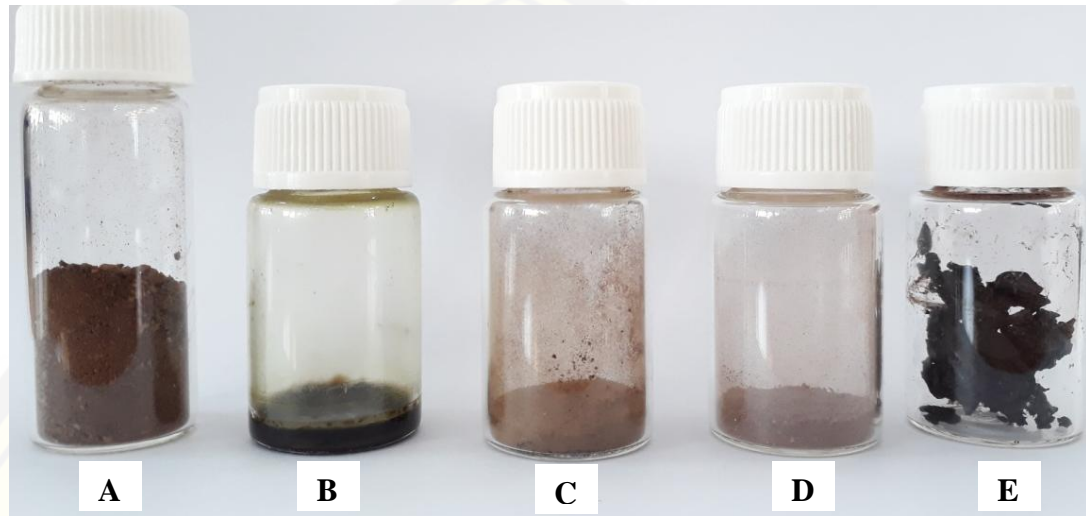
$$\begin{aligned}\text{Rendemen fraksi diklorometana} &= \frac{\text{Berat fraksi}}{\text{Berat ekstrak untuk fraksinasi}} \times 100\% \\ &= \frac{0,55 \text{ gram}}{4,00 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 13,75\%\end{aligned}$$

4. Rendemen Fraksi Etil Asetat

$$\begin{aligned}\text{Berat ekstrak untuk fraksinasi} &= 4,00 \text{ gram} \\ \text{Berat wadah + fraksi etil asetat} &= 11,25 \text{ gram} \\ \text{Berat wadah kosong} &= 10,26 \text{ gram} \\ \text{Fraksi etil asetat} &= 0,99 \text{ gram} \\ \text{Rendemen fraksi etil asetat} &= \frac{\text{Berat fraksi}}{\text{Berat ekstrak untuk fraksinasi}} \times 100\% \\ &= \frac{0,99 \text{ gram}}{4,00 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 24,75\%\end{aligned}$$

5. Rendemen Residu

$$\begin{aligned}\text{Berat ekstrak untuk fraksinasi} &= 4,00 \text{ gram} \\ \text{Berat wadah + residu kering} &= 12,15 \text{ gram} \\ \text{Berat wadah kosong} &= 10,38 \text{ gram} \\ \text{Fraksi residu kering} &= 1,77 \text{ gram} \\ \text{Rendemen residu} &= \frac{\text{Berat residu kering}}{\text{Berat ekstrak untuk fraksinasi}} \times 100\% \\ &= \frac{1,77 \text{ gram}}{4,00 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 44,25\%\end{aligned}$$



Gambar A) ekstrak metanol, B) fraksi heksana, C) fraksi diklorometana, D) fraksi etil asetat, dan E) residu liken *P. cetrata*

Lampiran 4.3 Perhitungan Pembuatan Media CAMHB

1. Pembuatan larutan induk MgCl_2

Bahan = $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Berat molekul = 203,3027 g/mol)

Berat molekul MgCl_2 = 95,211 g/mol

Berat molekul Mg^{2+} = 24,305 g/mol

Dibutuhkan larutan induk MgCl_2 dengan konsentrasi 10 mg Mg^{2+} /mL.

$$\begin{aligned} \text{Jumlah } \text{MgCl}_2 \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM } \text{MgCl}_2}{\text{BM } \text{Mg}^{2+}} \times 10 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{95,211 \text{ g/mol}}{24,305 \text{ g/mol}} \times 10 \text{ mg/mL} \\ &= 39,123 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah } \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM } \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}{\text{BM } \text{MgCl}_2} \times 39,123 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{203,3027 \text{ g/mol}}{95,211 \text{ g/mol}} \times 39,123 \text{ mg/mL} \\ &= 83,539 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Larutan induk MgCl_2 dibuat dengan melarutkan 835,39 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dalam 10 mL akuades.

2. Pembuatan larutan induk CaCl_2

Bahan = $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Berat molekul = 147,01 g/mol)

Berat molekul CaCl_2 = 110,98 g/mol

Berat molekul Ca^{2+} = 40,078 g/mol

Dibutuhkan larutan induk CaCl_2 dengan konsentrasi 10 mg Ca^{2+} /mL.

$$\begin{aligned} \text{Jumlah } \text{CaCl}_2 \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM } \text{CaCl}_2}{\text{BM } \text{Ca}^{2+}} \times 10 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{110,98 \text{ g/mol}}{40,078 \text{ g/mol}} \times 10 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= 27,691 \text{ mg/mL} \\
 \text{Jumlah CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{\text{BM CaCl}_2} \times 27,691 \text{ mg/mL} \\
 &= \frac{147,01 \text{ g/mol}}{110,98 \text{ g/mol}} \times 27,691 \text{ mg/mL} \\
 &= 36,681 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

Larutan induk CaCl_2 dibuat dengan melarutkan 366,81 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam 10 mL akuades.

3. Perhitungan MgCl_2 yang ditambahkan dalam media

Dibutuhkan konsentrasi 11,25 mg Mg^{2+} /L dalam media MHB. Penambahan Mg^{2+} dilakukan dengan menggunakan larutan induk MgCl_2 konsentrasi 10 mg Mg^{2+} /mL. Media yang digunakan adalah sebanyak 150 mL, maka dibutuhkan Mg^{2+} sebanyak:

$$\frac{150 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 11,25 \text{ mg Mg}^{2+} = 1,69 \text{ Mg}^{2+}$$

Jumlah larutan induk MgCl_2 yang ditambahkan:

$$\frac{1,69 \text{ mg Mg}^{2+}}{10 \text{ mg Mg}^{2+}} \times 1 \text{ mL} = 0,169 \text{ mL}$$

Larutan induk MgCl_2 konsentrasi 10 mg Mg^{2+} /mL ditambahkan sebanyak 0,169 mL ke dalam media MHB 150 mL.

4. Perhitungan CaCl_2 yang ditambahkan

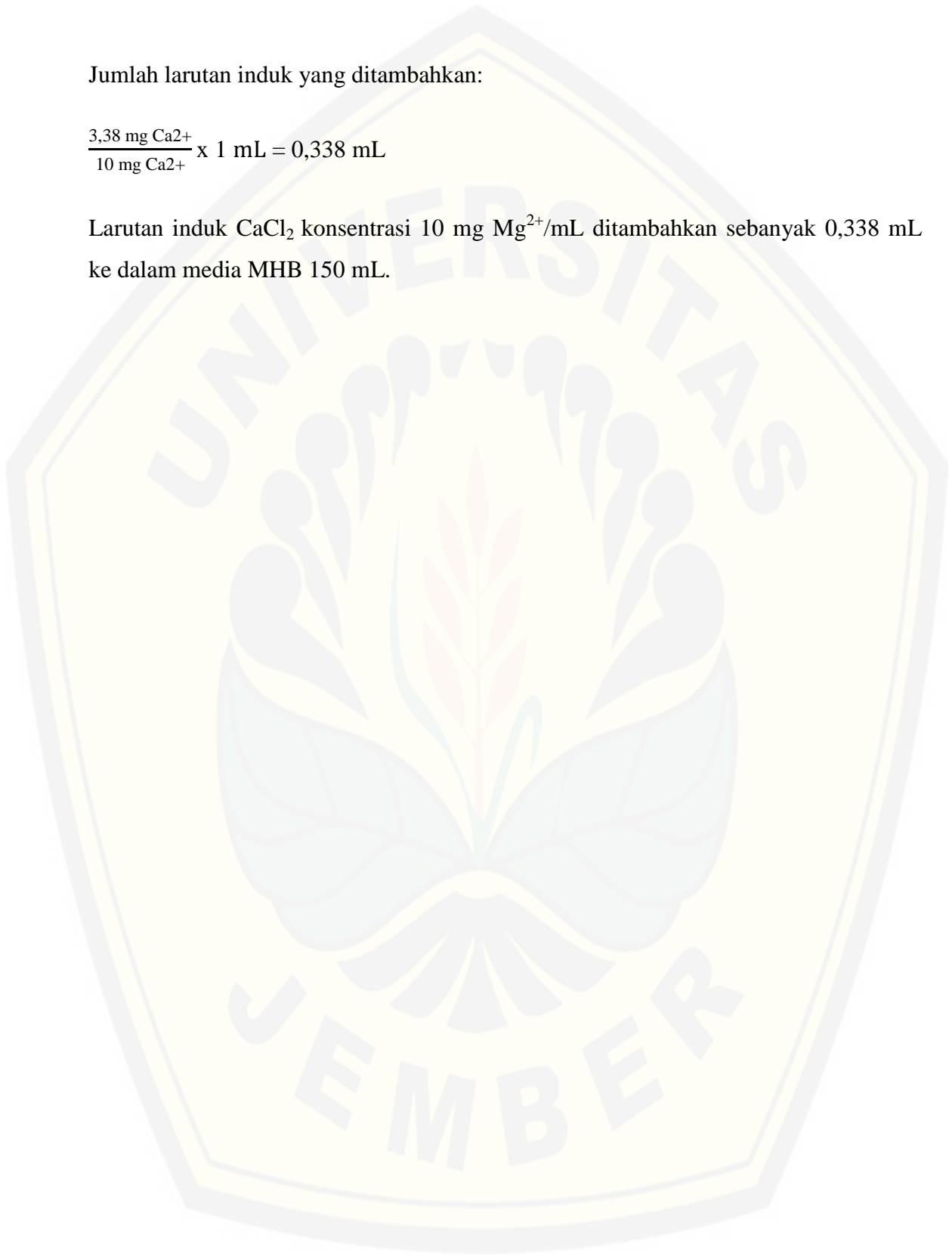
Dibutuhkan konsentrasi 22,5 mg Ca^{2+} /L dalam media MHB. Penambahan Ca^{2+} dilakukan dengan menggunakan larutan induk CaCl_2 konsentrasi 10 mg Ca^{2+} /mL. Media yang digunakan adalah sebanyak 150 mL, maka dibutuhkan Ca^{2+} sebanyak:

$$\frac{150 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 22,5 \text{ mg Ca}^{2+} = 3,38 \text{ Ca}^{2+}$$

Jumlah larutan induk yang ditambahkan:

$$\frac{3,38 \text{ mg Ca}^{2+}}{10 \text{ mg Ca}^{2+}} \times 1 \text{ mL} = 0,338 \text{ mL}$$

Larutan induk CaCl_2 konsentrasi $10 \text{ mg Mg}^{2+}/\text{mL}$ ditambahkan sebanyak $0,338 \text{ mL}$ ke dalam media MHB 150 mL .



Lampiran 4.4 Perhitungan Konsentrasi Kontrol Positif Gentamisin untuk Uji Aktivitas Antibakteri

1. Pembuatan larutan induk gentamisin

Bahan = larutan injeksi gentamisin sulfat 40 mg/mL

Berat molekul gentamisin sulfat = 575,675 g/mol

Berat molekul gentamisin = 477,596 g/mol

Konsentrasi gentamisin = $\frac{\text{BM gentamisin}}{\text{BM gentamisin sulfat}} \times 40 \text{ mg/mL}$
= $\frac{477,596 \text{ g/mol}}{575,675 \text{ g/mol}} \times 40 \text{ mg/mL}$
= 33,185 mg/mL
= 33185 $\mu\text{g/mL}$

Dibutuhkan larutan induk gentamisin 200 $\mu\text{g/mL}$:

33185 $\mu\text{g/mL}$ x volume yang dibutuhkan = 200 $\mu\text{g/mL}$ x 1000 μL

Volume yang dibutuhkan = 6,03 μL ad 1000 μL (dengan media CAMHB)

2. Pengenceran larutan induk gentamisin

Konsentrasi gentamisin yang dibutuhkan untuk uji aktivitas antibakteri adalah $4\mu\text{g/mL}$, $2\mu\text{g/mL}$, $1\mu\text{g/mL}$, dan $0,5\mu\text{g/mL}$.

Konsentrasi larutan yang diambil ($\mu\text{g/mL}$)	Volume diambil (μL)	+ Pelarut media CAMHB (μL)	= Konsentrasi dihasilkan ($\mu\text{g/mL}$)
200	80	1200	8
8	1000	1000	4
4	1000	1000	2
2	1000	1000	1
1	1000	1000	0,5

Contoh perhitungan pengenceran $1\mu\text{g/mL}$ menjadi $0,5\mu\text{g/mL}$:

$$1\mu\text{g/mL} \times \text{volume yang dibutuhkan} = 0,5\mu\text{g/mL} \times 2000\mu\text{L}$$

$$\text{Volume yang dibutuhkan} = 1000\mu\text{L} \text{ add } 1000\mu\text{L}$$

(dengan media CAMHB)

Lampiran 4.5 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Metanol, Fraksi Heksana, Fraksi Diklorometana, Fraksi Etil Asetat dan Residu Liken *P. cetrata* untuk Uji Aktivitas Antibakteri Metode Mikrodilusi

1. Perhitungan konsentrasi ekstrak metanol liken *P. cetrata*

Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken dilakukan dengan 6 konsentrasi yakni 2048 µg/mL, 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, dan 64 µg/mL.

$$\begin{aligned} \text{Penimbangan ekstrak metanol} &= 20,48 \text{ mg}/100\mu\text{L} \\ &= 204800 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL} \end{aligned}$$

Ekstrak metanol sebanyak 20,48 mg dilarutkan dalam 100 µL DMSO (100% DMSO) sehingga dihasilkan konsentrasi 204800 µg/mL. Kemudian larutan ini diencerkan secara bertingkat (*two-fold serial dilution*):

Konsentrasi larutan yang diambil (µg/mL)	Volume diambil (µL)	+ Pelarut DMSO (µL)	= Konsentrasi dihasilkan (µg/mL)
204800	50	50	102400
102400	50	50	51200
51200	50	50	25600
25600	50	50	12800
12800	50	50	6400

Contoh perhitungan pengenceran dari 204800 µg/mL menjadi 102400 µg/mL:

$$\begin{aligned} 204800 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL} \times \text{volume yang dibutuhkan} &= 102400 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL} \times 100 \text{ }\mu\text{L} \\ \text{Volume yang dibutuhkan} &= 50 \text{ }\mu\text{L ad } 100 \text{ }\mu\text{L (dengan DMSO)} \end{aligned}$$

Selanjutnya ekstrak metanol diencerkan 100x dengan menggunakan media CAMHB sehingga konsentrasi DMSO dalam larutan adalah 1%.

Konsentrasi larutan yang diambil ($\mu\text{g/mL}$)	Volume diambil (μL)	+	Pelarut media CAMHB (μL)	=	Konsentrasi dihasilkan ($\mu\text{g/mL}$)
204800	10		990		2048
102400	10		990		1024
51200	10		990		512
25600	10		990		256
12800	10		990		128
6400	10		990		64

Contoh perhitungan pengenceran dari 204800 $\mu\text{g/mL}$ menjadi 2048 $\mu\text{g/mL}$:

$$204800 \mu\text{g/mL} \times \text{volume yang dibutuhkan} = 2048 \mu\text{g/mL} \times 1000 \mu\text{L}$$

$$\text{Volume yang dibutuhkan} = 10 \mu\text{L ad } 100 \mu\text{L}$$

(dengan media CAMHB)

2. Perhitungan konsentrasi fraksi heksana liken *P. cetrata*

Uji aktivitas antibakteri fraksi heksana liken dilakukan dengan 6 konsentrasi yakni 2048 $\mu\text{g/mL}$, 1024 $\mu\text{g/mL}$, 512 $\mu\text{g/mL}$, 256 $\mu\text{g/mL}$, 128 $\mu\text{g/mL}$, dan 64 $\mu\text{g/mL}$

$$\begin{aligned} \text{Penimbangan fraksi heksana} &= 20,48 \text{ mg}/100\mu\text{L} \\ &= 204800 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Fraksi heksana sebanyak 20,48 mg dilarutkan dalam 100 μL DMSO (100% DMSO) sehingga konsentrasi yang dihasilkan adalah 204800 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian larutan ini diencerkan secara bertingkat (*two-fold serial dilution*):

Konsentrasi larutan yang diambil ($\mu\text{g/mL}$)	Volume diambil (μL)	+ Pelarut DMSO (μL)	= Konsentrasi dihasilkan ($\mu\text{g/mL}$)
204800	50	50	102400
102400	50	50	51200
51200	50	50	25600
25600	50	50	12800
12800	50	50	6400

Selanjutnya fraksi heksana diencerkan 100x dengan menggunakan media CAMHB sehingga konsentrasi DMSO dalam larutan adalah 1%.

Konsentrasi larutan yang diambil ($\mu\text{g/mL}$)	Volume diambil (μL)	+ Pelarut media CAMHB (μL)	= Konsentrasi dihasilkan ($\mu\text{g/mL}$)
204800	10	990	2048
102400	10	990	1024
51200	10	990	512
25600	10	990	256
12800	10	990	128
6400	10	990	64

3. Perhitungan konsentrasi fraksi diklorometana liken *P. cetrata*

Uji aktivitas antibakteri fraksi diklorometana liken dilakukan dengan 6 konsentrasi yakni 2048 µg/mL, 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, dan 64 µg/mL.

$$\begin{aligned}\text{Penimbangan fraksi diklorometana} &= 20,48 \text{ mg}/100\mu\text{L} \\ &= 204800 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}\end{aligned}$$

Fraksi diklorometana sebanyak 20,48 mg dilarutkan dalam 100 µL DMSO (100% DMSO) sehingga konsentrasi yang dihasilkan adalah 204800 µg/mL. Kemudian larutan ini diencerkan secara bertingkat (*two-fold serial dilution*):

Konsentrasi larutan yang diambil (µg/mL)	Volume diambil (µL)	+ Pelarut DMSO (µL)	= Konsentrasi dihasilkan (µg/mL)
204800	50	50	102400
102400	50	50	51200
51200	50	50	25600
25600	50	50	12800
12800	50	50	6400

Selanjutnya fraksi diklorometana diencerkan 100x dengan menggunakan media CAMHB sehingga konsentrasi DMSO dalam larutan adalah 1%.

Konsentrasi larutan yang diambil (µg/mL)	Volume diambil (µL)	+ Pelarut media CAMHB (µL)	= Konsentrasi dihasilkan (µg/mL)
204800	10	990	2048
102400	10	990	1024
51200	10	990	512
25600	10	990	256
12800	10	990	128
6400	10	990	64

4. Perhitungan konsentrasi fraksi etil asetat liken *P. cetrata*

Uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat liken dilakukan dengan 6 konsentrasi yakni 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, dan 32 µg/mL.

$$\begin{aligned} \text{Penimbangan fraksi etil asetat} &= 10,24 \text{ mg}/100\mu\text{L} \\ &= 102400 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL} \end{aligned}$$

Fraksi diklorometana sebanyak 10,24 mg dilarutkan dalam 100 µL DMSO (100% DMSO) sehingga konsentrasi yang dihasilkan adalah 102400 µg/mL. Kemudian larutan ini diencerkan secara bertingkat (*two-fold serial dilution*):

Konsentrasi larutan yang diambil (µg/mL)	Volume diambil (µL)	+ Pelarut DMSO (µL)	= Konsentrasi dihasilkan (µg/mL)
102400	50	50	51200
51200	50	50	25600
25600	50	50	12800
12800	50	50	6400
6400	50	50	3200

Selanjutnya fraksi etil asetat diencerkan 100x dengan menggunakan media CAMHB sehingga konsentrasi DMSO dalam larutan adalah 1%.

Konsentrasi larutan yang diambil (µg/mL)	Volume diambil (µL)	+ Pelarut media CAMHB (µL)	= Konsentrasi dihasilkan (µg/mL)
102400	10	990	1024
51200	10	990	512
25600	10	990	256
12800	10	990	128
6400	10	990	64
3200	10	990	32

5. Perhitungan konsentrasi residu liken *P. cetrata*

Uji aktivitas antibakteri residu liken dilakukan dengan 6 konsentrasi yakni 4096 µg/mL, 2048 µg/mL, 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, dan 128 µg/mL.

$$\begin{aligned} \text{Penimbangan residu} &= 40,96 \text{ mg}/100\mu\text{L} \\ &= 409600 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL} \end{aligned}$$

Residu sebanyak 40,96 mg dilarutkan dalam 100 µL DMSO (100% DMSO) sehingga konsentrasi yang dihasilkan adalah 409600 µg/mL. Kemudian larutan ini diencerkan secara bertingkat (*two-fold serial dilution*):

Konsentrasi larutan yang diambil (µg/mL)	Volume diambil (µL)	+ Pelarut DMSO (µL)	= Konsentrasi dihasilkan (µg/mL)
409600	50	50	204800
204800	50	50	102400
102400	50	50	51200
51200	50	50	25600
25600	50	50	12800

Selanjutnya residu diencerkan 100x dengan menggunakan media CAMHB sehingga konsentrasi DMSO dalam larutan adalah 1%.

Konsentrasi larutan yang diambil (µg/mL)	Volume diambil (µL)	+ Pelarut media CAMHB (µL)	= Konsentrasi dihasilkan (µg/mL)
409600	10	990	4096
204800	10	990	2048
102400	10	990	1024
51200	10	990	512
25600	10	990	256
12800	10	990	128

Lampiran 4.6 Data Hasil dan Persentase Penghambatan Kontrol Positif/Gentamisin terhadap Pertumbuhan Bakteri *P. aeruginosa*

1. Data absorbansi kontrol negatif dan kontrol media untuk gentamisin

	Kontrol negatif (media CAMHB + bakteri)			Kontrol media (media CAMHB)		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
Abs	1,054	1,052	1,069	0,115	0,117	0,126
	1,065	1,066	1,054	0,120	0,117	0,115
	1,078	1,088	1,054	0,125	0,112	0,111
Rerata	1,066	1,069	1,059	0,120	0,115	0,117

Keterangan:

Abs = absorbansi

Rep = replikasi

2. Hasil uji aktivitas antibakteri kontrol positif gentamisin

a. Data hasil dan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Uji	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
		Kontrol uji	Kontrol negatif	Kontrol media	
4	0,200	0,196			99,612
2	0,165	0,138			97,216
1	0,171	0,094	1,066	0,120	91,860
0,5	0,257	0,101			83,474

Contoh perhitungan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 4 µg/mL (replikasi 1):

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(\text{Abs.R} - \text{Abs.S})}{(\text{Abs.P} - \text{Abs.Q})} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

Abs = absorbansi

P = kontrol negatif (media + suspensi bakteri)

Q = kontrol media (media)

R = uji (gentamisin + suspensi bakteri)

S = kontrol uji (gentamisin + media)

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(0,200 - 0,196)}{(1,066 - 0,120)} \right) \times 100 \% = 99,612 \%$$

Replikasi 2

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif Kontrol media	
4	0,202	0,200		99,755
2	0,156	0,133		97,519
1	0,170	0,092	1,069 0,115	91,754
0,5	0,284	0,111		81,866

Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
4	0,197	0,195		99,823
2	0,146	0,126		97,841
1	0,169	0,097	1,059	92,286
0,5	0,259	0,099	0,117	83,015

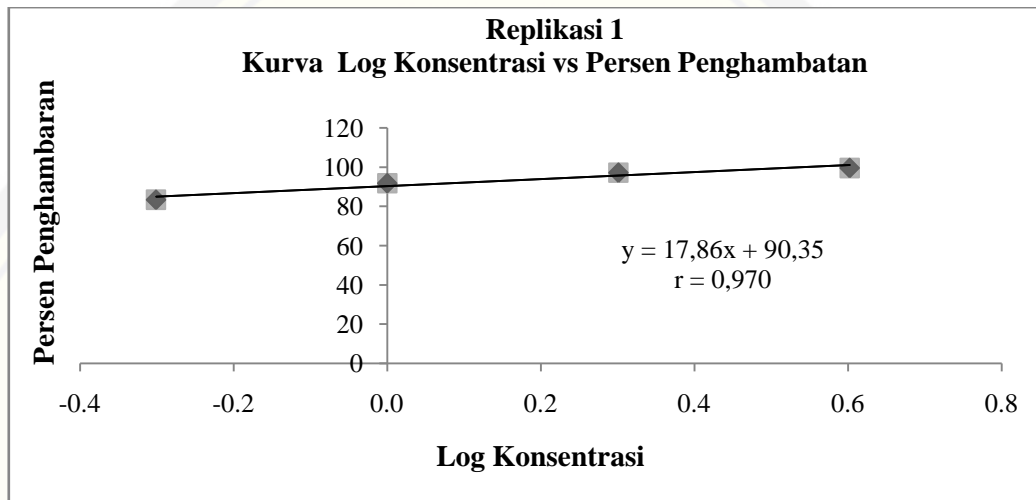
Persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Log konsentrasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)				SD (%)	CV (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rerata		
0.602	4	99,612	99,755	99,823	99,730	0,108	0,108
0.301	2	97,216	97,519	97,841	97,526	0,313	0,321
0.000	1	91,860	91,754	92,286	91,967	0,281	0,306
-0.301	0,5	83,474	81,866	83,015	82,785	0,828	1,001

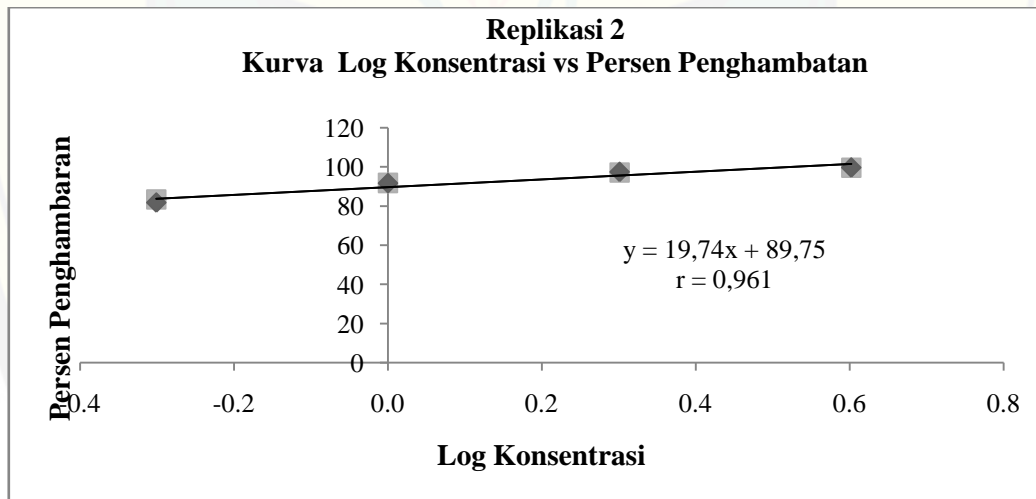
Keterangan:

Rep = replikasi

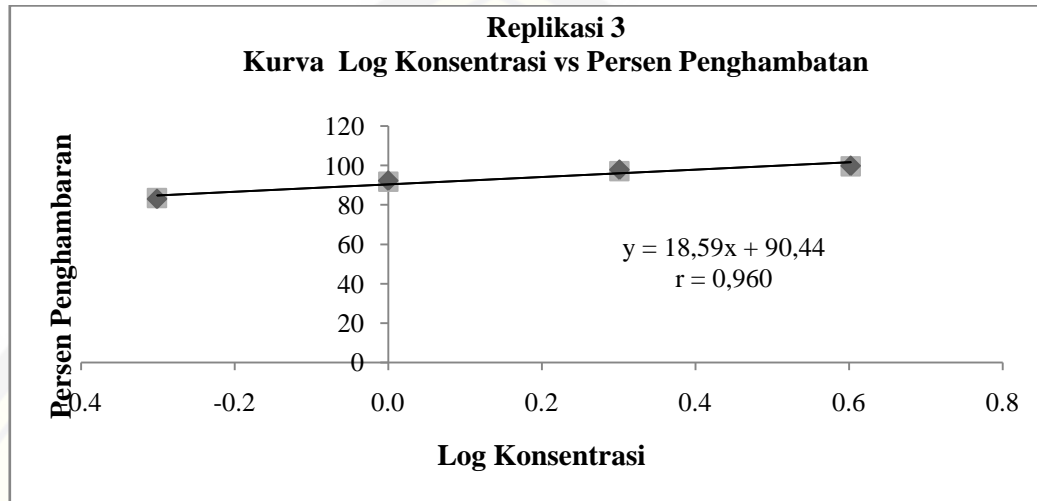
- b. Kurva pengaruh konsentrasi gentamisin terhadap persentase penghambatan pertumbuhan bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=4$ adalah 0,950.
2. $r = 0,970 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi gentamisin dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=4$ adalah 0,950.
2. $r = 0,961 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi gentamisin dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=4$ adalah 0,950.
2. $r = 0,960 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi gentamisin dengan persen penghambatan.

Lampiran 4.7 IC₅₀ Kontrol Positif Gentamisin

1. Penentuan IC₅₀ Kontrol Positif Gentamisin terhadap *P. aeruginosa* menggunakan Analisis Probit

a. Data Hasil Analisis Probit

Replikasi 1

Confidence Limits						
Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	,101	,	,	-,995	,	,
0,02	,127	,	,	-,897	,	,
0,03	,147	,	,	-,834	,	,
0,04	,163	,	,	-,787	,	,
0,05	,178	,	,	-,749	,	,
0,06	,192	,	,	-,716	,	,
0,07	,205	,	,	-,688	,	,
0,08	,218	,	,	-,662	,	,
0,09	,230	,	,	-,639	,	,
0,1	,241	,	,	-,618	,	,
0,15	,296	,	,	-,529	,	,
0,2	,348	,	,	-,459	,	,
0,25	,399	,	,	-,399	,	,
0,3	,452	,	,	-,345	,	,
0,35	,508	,	,	-,294	,	,
0,4	,567	,	,	-,247	,	,
0,45	,630	,	,	-,201	,	,
0,5	,700	,	,	-,155	,	,

0,55	,777	,	,	-,110	,	,
0,6	,863	,	,	-,064	,	,
0,65	,964	,	,	-,016	,	,
0,7	1,082	,	,	,034	,	,
0,75	1,225	,	,	,088	,	,
0,8	1,408	,	,	,149	,	,
0,85	1,656	,	,	,219	,	,
0,9	2,030	,	,	,307	,	,
0,91	2,132	,	,	,329	,	,
0,92	2,249	,	,	,352	,	,
0,93	2,385	,	,	,378	,	,
0,94	2,547	,	,	,406	,	,
0,95	2,745	,	,	,439	,	,
0,96	2,998	,	,	,477	,	,
0,97	3,340	,	,	,524	,	,
0,98	3,856	,	,	,586	,	,
0,99	4,837	,	,	,685	,	,

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	,107	,	,	-,971	,	,
0,02	,132	,	,	-,878	,	,
0,03	,152	,	,	-,819	,	,
0,04	,168	,	,	-,775	,	,
0,05	,183	,	,	-,739	,	,

0,06	,196	,	,	-,708	,	,
0,07	,208	,	,	-,681	,	,
0,08	,220	,	,	-,657	,	,
0,09	,232	,	,	-,635	,	,
0,1	,243	,	,	-,615	,	,
0,15	,294	,	,	-,531	,	,
0,2	,343	,	,	-,465	,	,
0,25	,391	,	,	-,408	,	,
0,3	,440	,	,	-,356	,	,
0,35	,491	,	,	-,309	,	,
0,4	,544	,	,	-,264	,	,
0,45	,602	,	,	-,220	,	,
<u>0,5</u>	<u>,664</u>	,	,	-,178	,	,
0,55	,733	,	,	-,135	,	,
0,6	,811	,	,	-,091	,	,
0,65	,899	,	,	-,046	,	,
0,7	1,003	,	,	,001	,	,
0,75	1,128	,	,	,052	,	,
0,8	1,287	,	,	,109	,	,
0,85	1,499	,	,	,176	,	,
0,9	1,818	,	,	,259	,	,
0,91	1,904	,	,	,280	,	,
0,92	2,003	,	,	,302	,	,
0,93	2,117	,	,	,326	,	,
0,94	2,253	,	,	,353	,	,
0,95	2,418	,	,	,383	,	,
0,96	2,627	,	,	,420	,	,
0,97	2,910	,	,	,464	,	,

0,98	3,333	,	,	,523	,	,
0,99	4,129	,	,	,616	,	,

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	,126	,	,	-,900	,	,
0,02	,154	,	,	-,813	,	,
0,03	,175	,	,	-,757	,	,
0,04	,193	,	,	-,715	,	,
0,05	,208	,	,	-,681	,	,
0,06	,223	,	,	-,652	,	,
0,07	,236	,	,	-,627	,	,
0,08	,249	,	,	-,604	,	,
0,09	,261	,	,	-,584	,	,
0,1	,273	,	,	-,565	,	,
0,15	,327	,	,	-,486	,	,
0,2	,377	,	,	-,423	,	,
0,25	,427	,	,	-,369	,	,
0,3	,477	,	,	-,321	,	,
0,35	,529	,	,	-,277	,	,
0,4	,583	,	,	-,234	,	,
0,45	,641	,	,	-,193	,	,
0,5	,704	,	,	-,153	,	,
0,55	,772	,	,	-,112	,	,

0,6	,849	,	,	-,071	,	,
0,65	,936	,	,	-,029	,	,
0,7	1,037	,	,	,016	,	,
0,75	1,159	,	,	,064	,	,
0,8	1,311	,	,	,118	,	,
0,85	1,515	,	,	,180	,	,
0,9	1,816	,	,	,259	,	,
0,91	1,897	,	,	,278	,	,
0,92	1,990	,	,	,299	,	,
0,93	2,096	,	,	,321	,	,
0,94	2,223	,	,	,347	,	,
0,95	2,376	,	,	,376	,	,
0,96	2,569	,	,	,410	,	,
0,97	2,829	,	,	,452	,	,
0,98	3,215	,	,	,507	,	,
0,99	3,934	,	,	,595	,	,

a. Logarithm base = 10.

2. IC₅₀ Fraksi Heksana Liken *P. cetrata* terhadap *P. aeruginosa*

Uji aktivitas antibakteri	IC ₅₀ (µg/mL)	Rerata (µg/mL)	SD (µg/mL)	CV (%)
Replikasi 1	0,7			
Replikasi 2	0,664	0,689	0,022	3,196
Replikasi 3	0,704			

Lampiran 4.8 Data Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol, Fraksi Heksana, Fraksi Diklorometana, Fraksi Etil Asetat dan Residu Liken *P. cetrata*

1. Data absorbansi kontrol negatif serta kontrol media

a. Data absorbansi kontrol negatif serta kontrol media untuk ekstrak dan fraksi

	Kontrol negatif (DMSO 1% + bakteri)			Kontrol media (DMSO 1%)		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
	1,050	1,053	1,028	0,100	0,101	0,094
Abs	1,036	1,043	1,021	0,098	0,097	0,096
	1,034	1,041	1,043	0,101	0,101	0,094
Rerata	1,040	1,046	1,031	0,100	0,100	0,095

Keterangan:

Abs = absorbansi

Rep = replikasi

Untuk memastikan bahwa kontrol negatif ekstrak dan fraksi (DMSO 1%) tidak memberikan penghambatan pertumbuhan pada bakteri *P. aeruginosa*, maka juga dilakukan perhitungan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri oleh DMSO 1%. Perhitungan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri oleh DMSO 1% memerlukan data kontrol negatif berupa media CAMHB.

b. Data absorbansi kontrol negatif serta kontrol media untuk DMSO 1%

	Kontrol negatif (media CAMHB + bakteri)			Kontrol media (media CAMHB)		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
	1,054	1,066	1,069	0,111	0,117	0,128
Abs	1,066	1,065	1,074	0,115	0,111	0,141
	1,054	1,052	1,078	0,125	0,115	0,141
Rerata	1,058	1,061	1,074	0,117	0,114	0,137

Keterangan:

Abs = absorbansi

Rep = replikasi

c. Persentase penghambatan pertumbuhan bakteri oleh DMSO 1%

Replikasi	Absorbansi				Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)	Rerata (%)	SD (%)	CV (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	Kontrol media				
1	1,040	0,100	1,058	0,117	0,071			
2	1,046	0,100	1,061	0,114	0,070	0,083	0,021	25,207
3	1,031	0,095	1,074	0,137	0,107			

Contoh perhitungan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri oleh DMSO1%:

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(\text{Abs.R} - \text{Abs.S})}{(\text{Abs.P} - \text{Abs.Q})} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

Abs = absorbansi

P = kontrol negatif (media + suspensi bakteri)

Q = kontrol media (media)

R = uji (DMSO 1% + suspensi bakteri)

S = kontrol uji (DMSO 1% + media)

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(1,040-0,100)}{(1,058-0,117)} \right) \times 100 \% = 0,071 \%$$

2. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken *P. cetrata*

a. Data hasil dan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Uji	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
		Kontrol uji	Kontrol negatif	Kontrol media	
2048	0,730	0,346			59,113
1024	0,747	0,275			49,823
512	0,818	0,107	1,040	0,100	24,291
256	0,947	0,101			9,929
128	0,948	0,096			9,362
64	1,030	0,095			0,567

Contoh perhitungan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri pada uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol liken konsentrasi 2048 $\mu\text{g/mL}$:

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(\text{Abs.R}-\text{Abs.S})}{(\text{Abs.P}-\text{Abs.Q})} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

Abs = absorbansi

P = kontrol negatif (DMSO 1% + suspensi bakteri)

Q = kontrol media (DMSO 1%)

R = uji (ekstrak/fraksi + suspensi bakteri)

S = kontrol uji (ekstrak/fraksi + media)

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(0,730-0,346)}{(1,040-0,100)} \right) \times 100 \% = 59,113 \%$$

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
2048	0,729	0,323		57,082
1024	0,733	0,259		49,824
512	0,839	0,113		23,256
256	0,946	0,103	1,046	10,958
128	0,947	0,092		9,549
64	1,031	0,091		0,564

Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
2048	0,731	0,359		60,292
1024	0,740	0,236		46,083
512	0,843	0,110		21,688
256	0,939	0,107	1,031	11,040
128	0,947	0,096		9,046
64	1,026	0,095		0,605

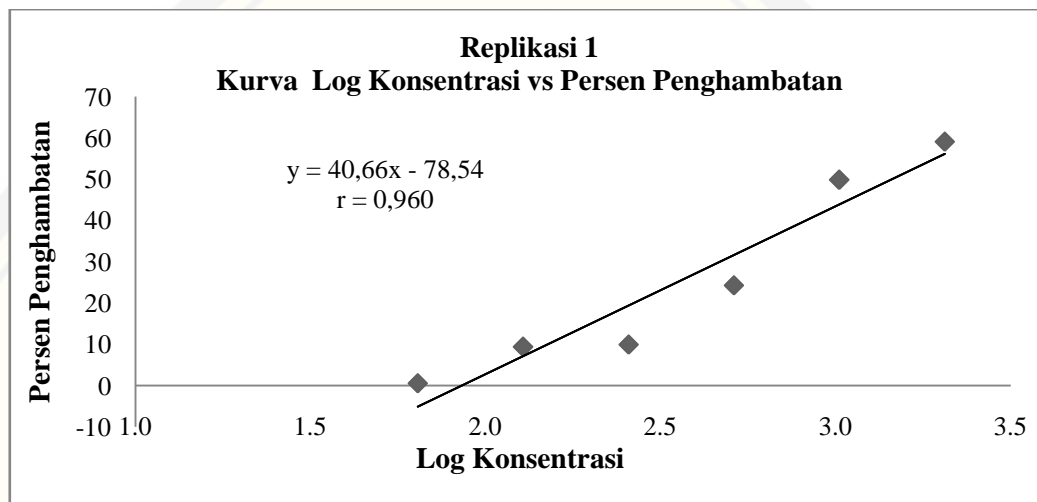
Persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Log konsentrasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)			SD (%)	CV (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
3,311	2048	59,113	57,082	60,292	1,624	2,760
3,010	1024	49,823	49,824	46,083	2,160	4,446
2,709	512	24,291	23,256	21,688	1,310	5,678
2,408	256	9,929	10,958	11,040	0,619	5,818
2,107	128	9,362	9,549	9,046	0,254	2,730
1,806	64	0,567	0,564	0,605	0,023	3,985

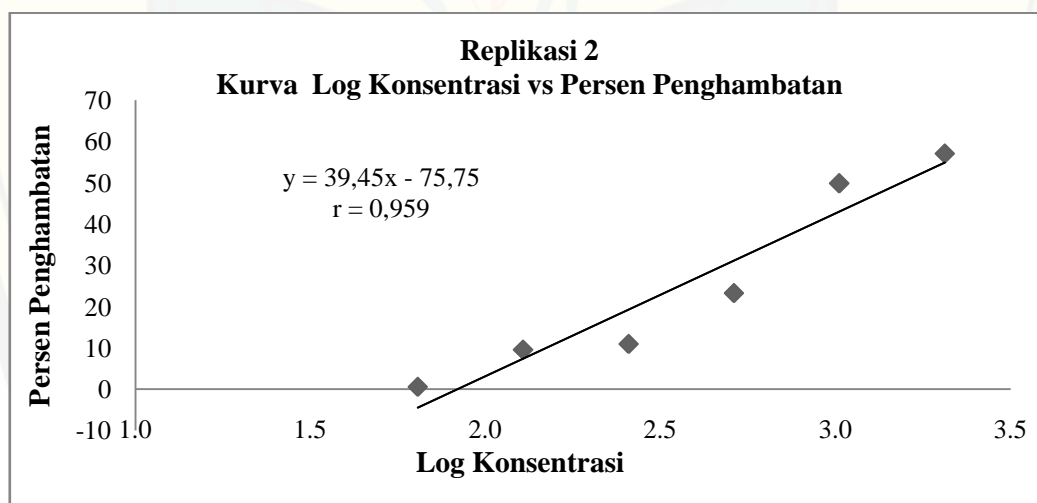
Keterangan:

Rep = replikasi

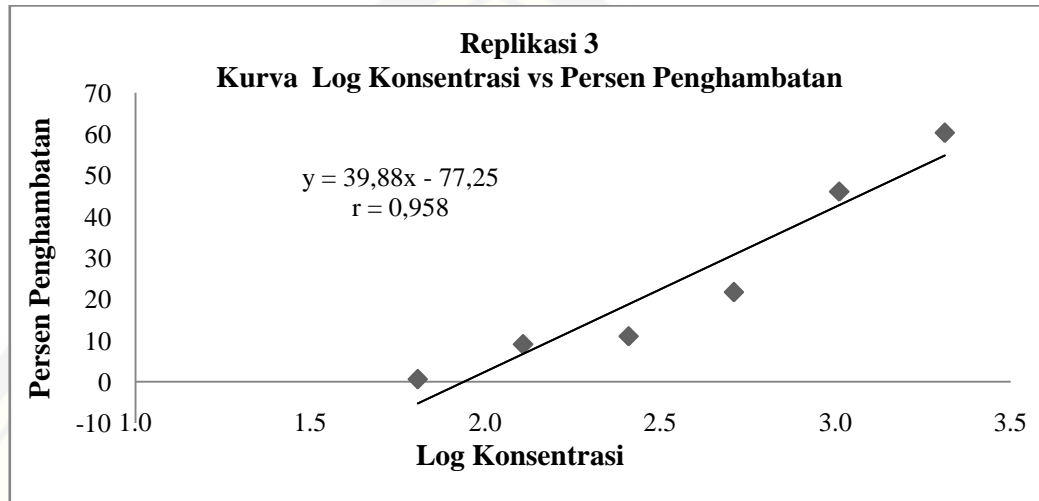
- b. Kurva pengaruh konsentrasi ekstrak metanol liken *P. cetrata* terhadap persentase penghambatan pertumbuhan bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,960 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi ekstrak metanol liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,959 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi ekstrak metanol liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,958 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi ekstrak metanol liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.

3. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi heksana liken *P. cetrata*

- a. Data hasil dan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
2048	0,692	0,382		66,986
1024	0,717	0,190		43,865
512	0,827	0,168	1,040	29,894
256	0,890	0,112	0,100	17,199
128	0,976	0,103		7,092
64	1,019	0,101		2,305

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
2048	0,709	0,372		64,412
1024	0,738	0,207		43,904
512	0,799	0,143	1,046	30,620
256	0,904	0,122		17,301
128	1,010	0,117		5,567
64	1,031	0,112		2,854

Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
2048	0,692	0,372		65,776
1024	0,707	0,181		43,803
512	0,781	0,115	1,031	28,811
256	0,893	0,112		16,524
128	0,979	0,110		7,158
64	1,015	0,105		2,742

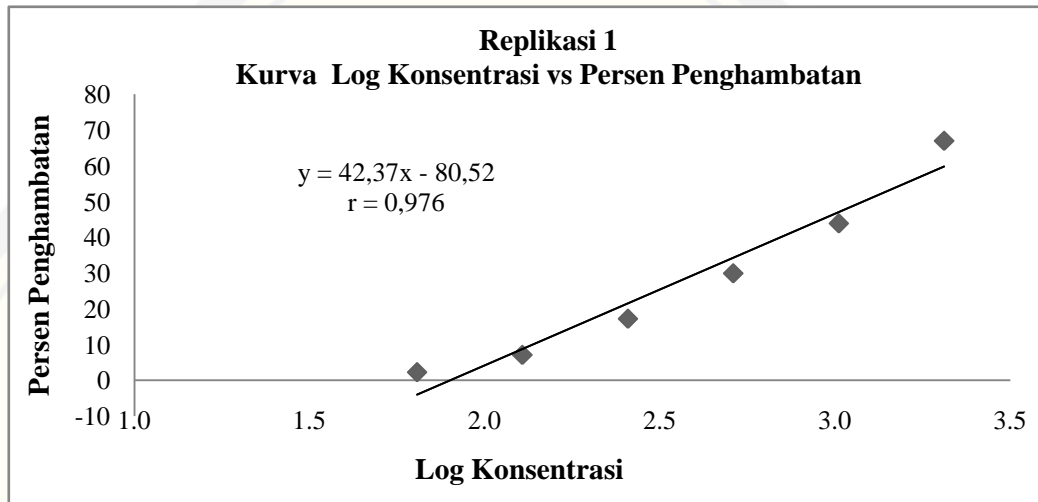
Persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Log konsentrasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)			SD (%)	CV (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
3,311	2048	66,986	64,412	65,776	1,288	1,960
3,010	1024	43,865	43,904	43,803	0,051	0,116
2,709	512	29,894	30,620	28,811	0,911	3,058
2,408	256	17,199	17,301	16,524	0,422	2,481
2,107	128	7,092	5,567	7,158	0,900	13,625
1,806	64	2,305	2,854	2,742	0,290	11,018

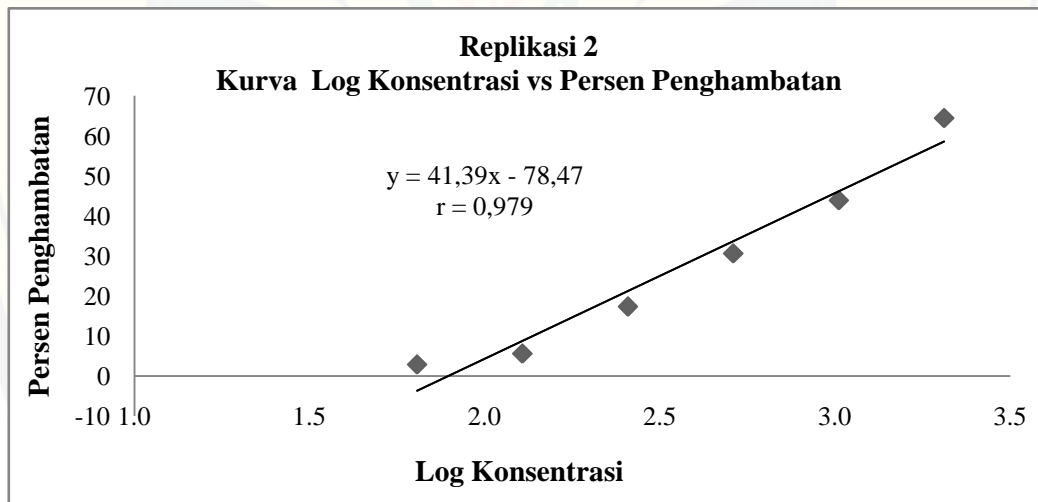
Keterangan:

Rep = replikasi

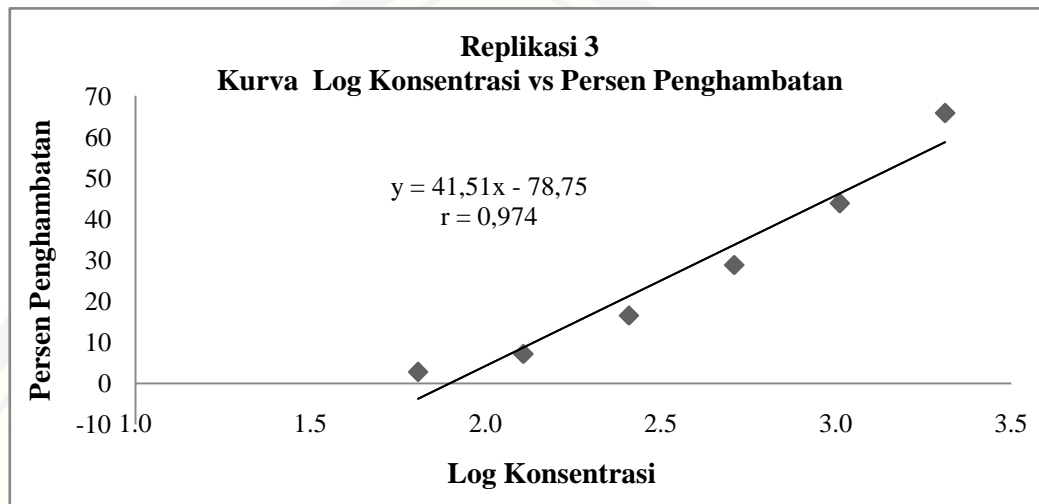
- b. Kurva pengaruh konsentrasi fraksi heksana liken *P. cetrata* terhadap persentase penghambatan pertumbuhan bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,976 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi fraksi heksana liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,979 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi fraksi heksana liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,974 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi fraksi heksana liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.

4. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi diklorometana liken *P. cetrata*

- a. Data hasil dan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
2048	0,838	0,459		59,645
1024	0,831	0,347		48,475
512	0,787	0,245	1,040	42,411
256	0,861	0,159		25,355
128	0,900	0,116		16,560
64	1,050	0,140		3,191

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Kontrol media	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif		
2048	0,852	0,473			59,866
1024	0,806	0,324			48,978
512	0,781	0,236	1,046	0,100	42,424
256	0,875	0,160			24,383
128	0,941	0,141			15,398
64	1,053	0,137			3,101

Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Kontrol media	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif		
2048	0,874	0,483			58,226
1024	0,843	0,349			47,222
512	0,795	0,256	1,031	0,095	42,450
256	0,857	0,161			25,641
128	0,893	0,121			17,486
64	1,038	0,131			3,027

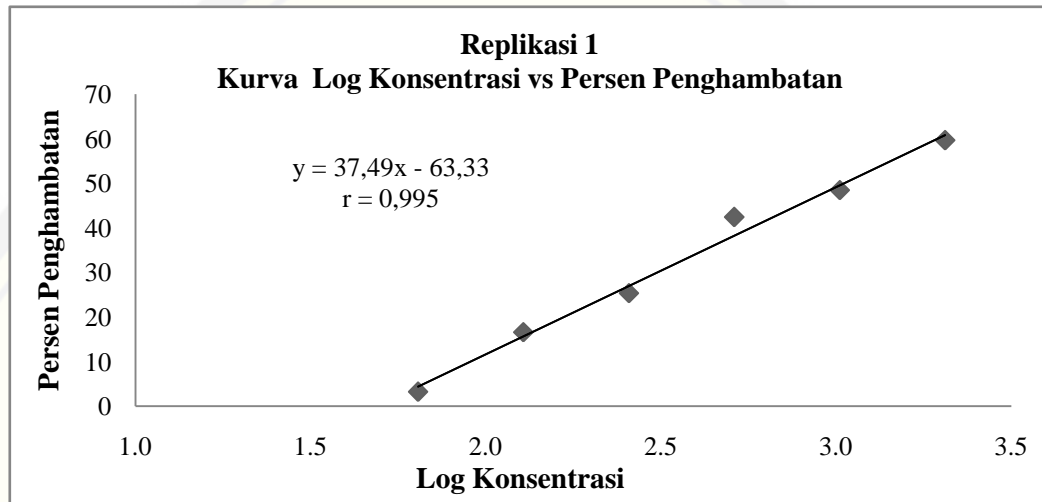
Persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Log konsentrasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)			SD (%)	CV (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
3,311	2048	59,645	59,866	58,226	0,890	1,502
3,010	1024	48,475	48,978	47,222	0,904	1,875
2,709	512	42,411	42,424	42,450	0,020	0,047
2,408	256	25,355	24,383	25,641	0,659	2,623
2,107	128	16,560	15,398	17,486	1,046	6,347
1,806	64	3,191	3,101	3,027	0,082	2,651

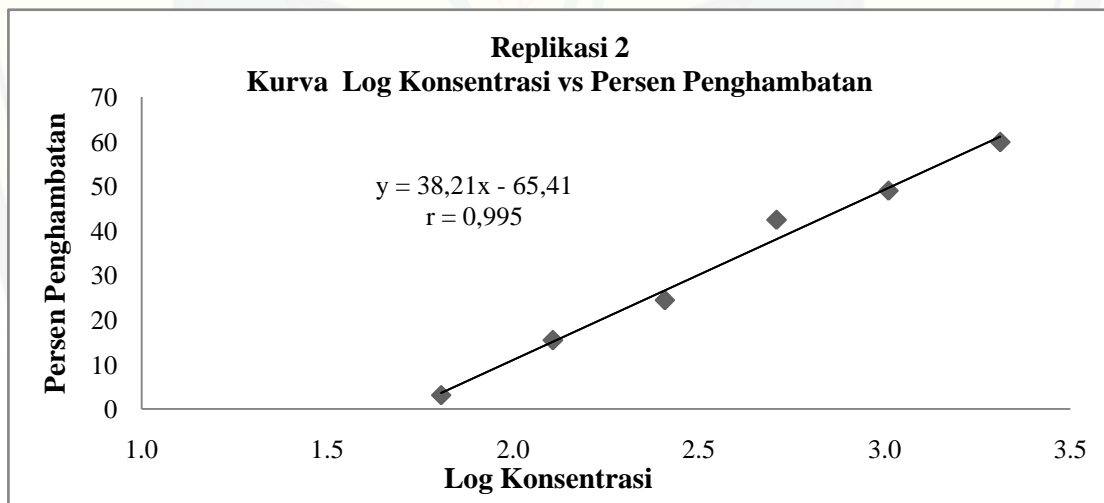
Keterangan:

Rep = replikasi

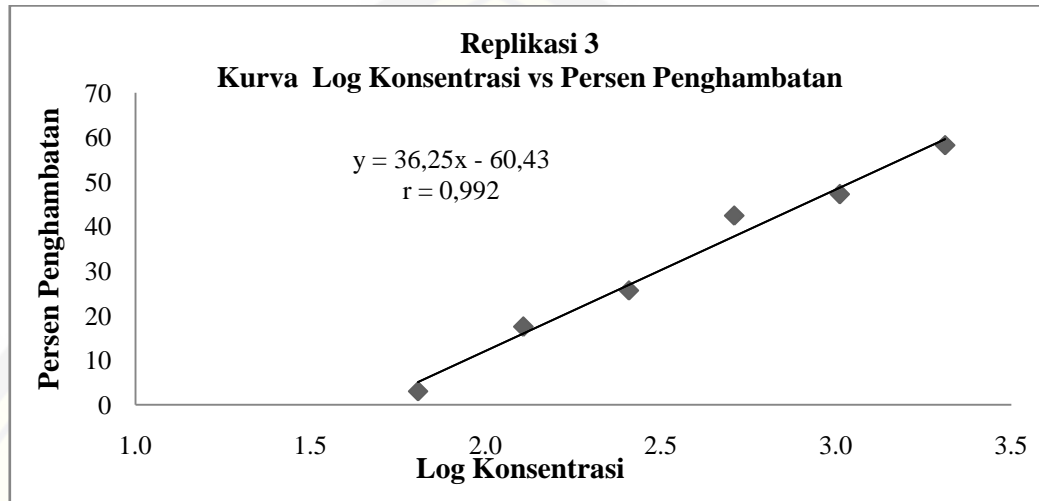
- b. Kurva pengaruh konsentrasi fraksi diklorometana liken *P. cetrata* terhadap persentase penghambatan pertumbuhan bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,995 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi fraksi diklorometana liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,995 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi fraksi diklorometana liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,992 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi fraksi diklorometana liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.

5. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat liken *P. cetrata*

- a. Data hasil dan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
1024	0,653	0,227		54,645
512	0,779	0,145		32,553
256	0,876	0,133	1,040	20,993
128	0,943	0,121		12,482
64	1,003	0,116		5,674
32	1,018	0,109		3,369

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
1024	0,646	0,208		53,700
512	0,752	0,131		34,390
256	0,835	0,116		23,996
128	0,943	0,125	1,046	13,531
64	0,999	0,115		6,554
32	0,999	0,098		4,686

Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
1024	0,610	0,178		53,811
512	0,708	0,122		37,358
256	0,827	0,109		23,326
128	0,906	0,108	1,031	14,744
64	0,983	0,100		5,627
32	0,984	0,094		4,915

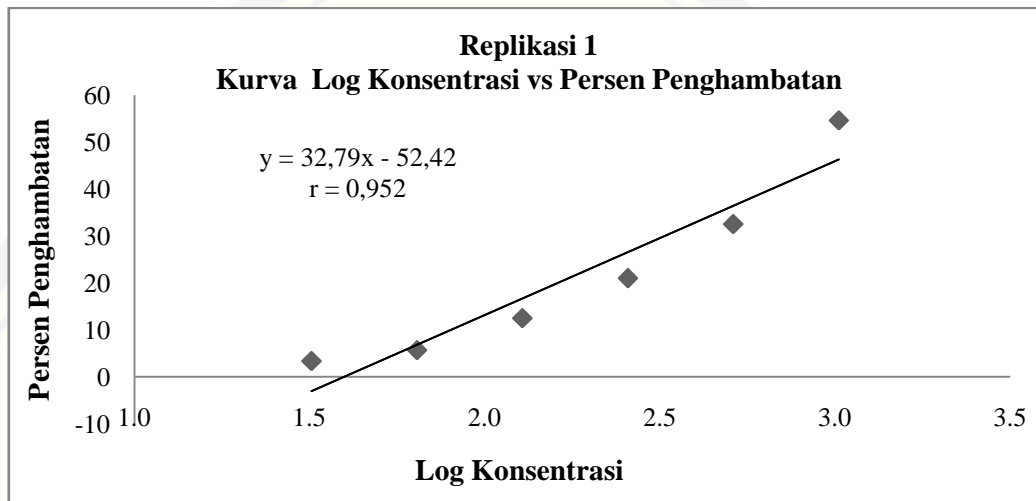
Persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Log konsentrasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)			SD (%)	CV (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
3,010	1024	54,645	53,700	53,811	0,517	0,956
2,709	512	32,553	34,390	37,358	2,424	6,973
2,408	256	20,993	23,996	23,326	1,576	6,923
2,107	128	12,482	13,531	14,744	1,132	8,330
1,806	64	5,674	6,554	5,627	0,522	8,775
1,505	32	3,369	4,686	4,915	0,834	19,301

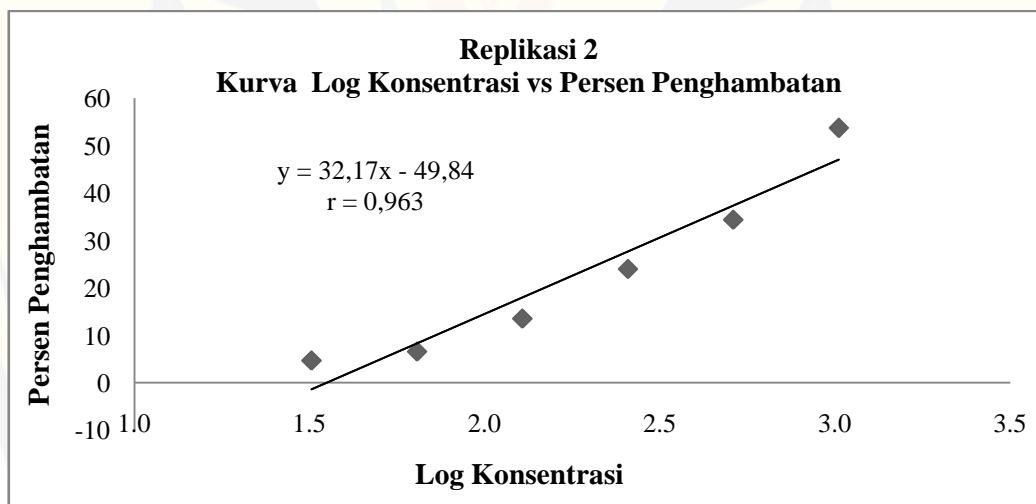
Keterangan:

Rep = replikasi

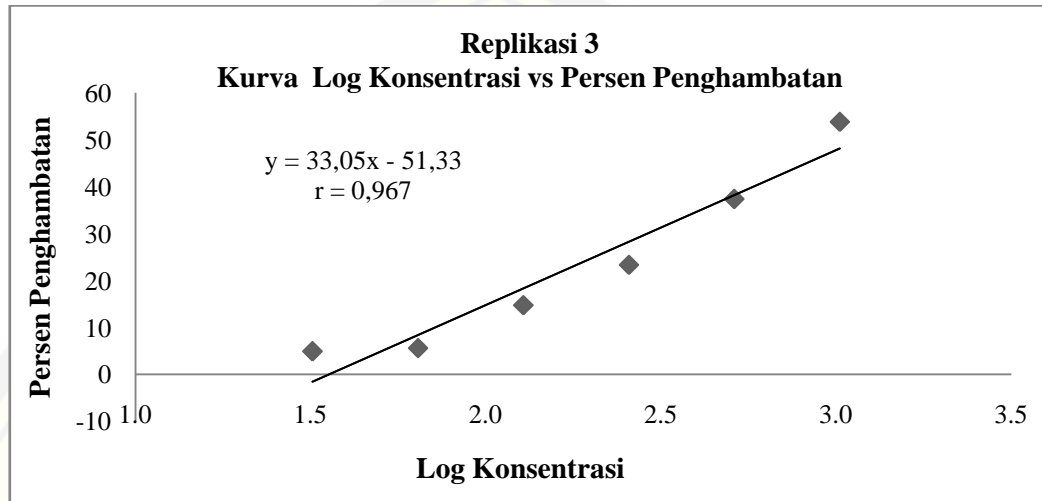
- b. Kurva pengaruh konsentrasi fraksi etil asetat liken *P. cetrata* terhadap persentase penghambatan pertumbuhan bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,952 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi fraksi etil asetat liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,963 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi fraksi etil asetat liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=5$ adalah 0,811.
2. $r = 0,967 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi fraksi etil asetat liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.

5. Hasil uji aktivitas antibakteri residu liken *P. cetrata*

- a. Data hasil dan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
4096	0,658	0,293		61,206
2048	0,664	0,200		50,709
1024	0,900	0,187	1,040	24,113
512	0,988	0,155		11,312
256	0,999	0,122		6,702
128	1,013	0,118		4,823

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Kontrol media	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif		
4096	0,639	0,332			67,512
2048	0,640	0,202			53,700
1024	0,836	0,150			27,519
512	0,991	0,151	1,046	0,100	11,170
256	0,988	0,113			7,505
128	1,009	0,107			4,651

Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Kontrol media	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif		
4096	0,645	0,324			65,741
2048	0,648	0,216			53,882
1024	0,821	0,154			28,811
512	0,964	0,147	1,031	0,095	12,749
256	0,974	0,114			8,120
128	0,985	0,100			5,484

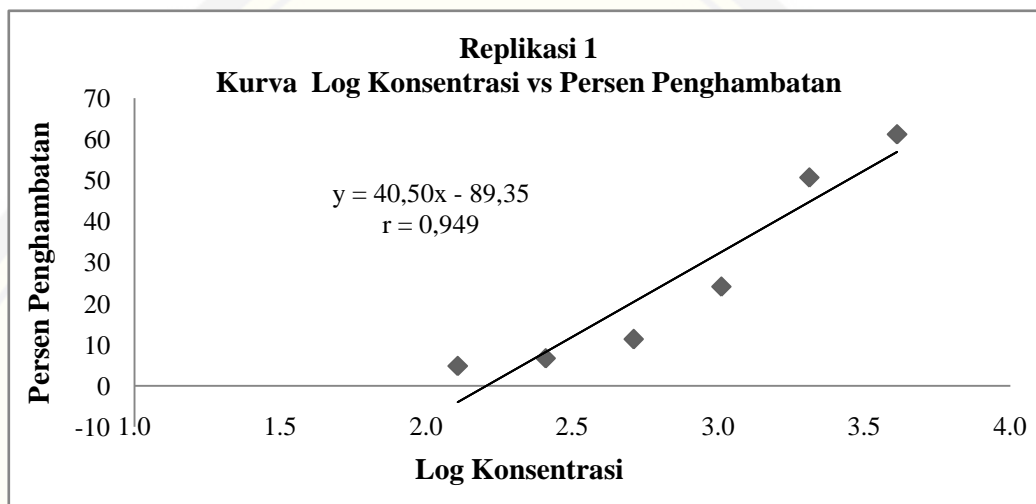
Persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

Log konsentrasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)			SD (%)	CV (%)
		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
3,612	4096	61,206	67,512	65,741	3,253	5,018
3,311	2048	50,709	53,700	53,882	1,781	3,376
3,010	1024	24,113	27,519	28,811	2,427	9,050
2,709	512	11,312	11,170	12,749	0,874	7,440
2,408	256	6,702	7,505	8,120	0,711	9,552
2,107	128	4,823	4,651	5,484	0,440	8,824

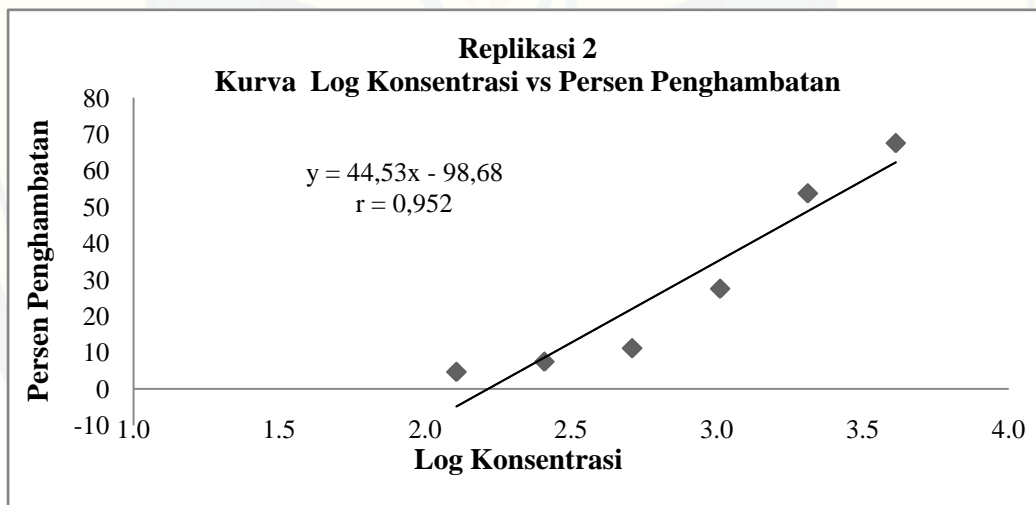
Keterangan:

Rep = replikasi

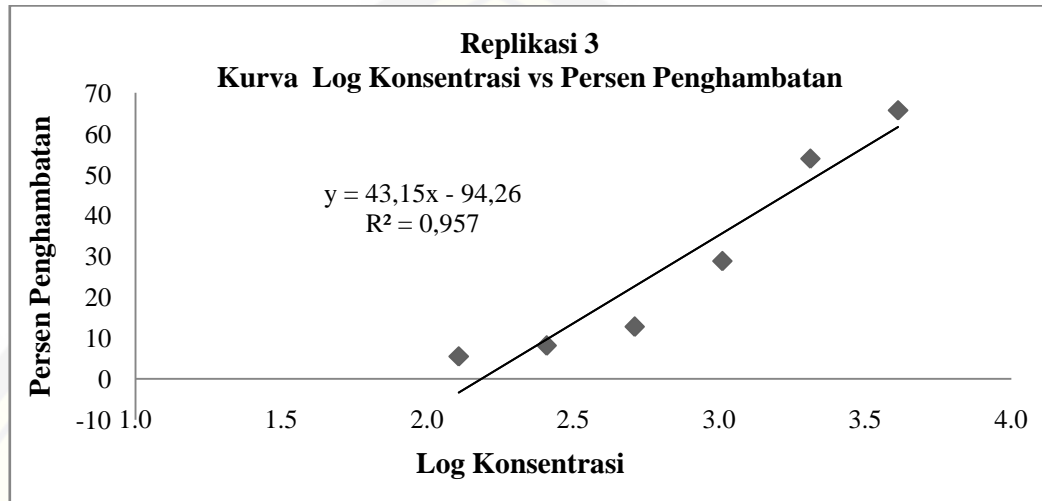
- b. Kurva pengaruh konsentrasi residu liken *P. cetrata* terhadap persentase penghambatan pertumbuhan bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,949 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi residu liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,952 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi residu liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($P < 0,05$) dan $n=6$ adalah 0,811.
2. $r = 0,957 > r$ tabel, maka artinya terdapat hubungan linier antara konsentrasi residu liken *P. cetrata* dengan persen penghambatan.

Lampiran 4.9 IC₅₀ Ekstrak Metanol, Fraksi Heksana, Fraksi Diklorometana, Fraksi Etil Asetat dan Residu Liken *P. cetrata*

1. Penentuan IC₅₀ Ekstrak Metanol Liken *P. cetrata* terhadap *P. aeruginosa* menggunakan Analisis Probit

a. Data Hasil Analisis Probit

Replikasi 1

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	43,768	9,130	101,295	1,641	,960	2,006
0,02	65,100	16,172	137,656	1,814	1,209	2,139
0,03	83,748	23,231	167,315	1,923	1,366	2,224
0,04	101,221	30,497	193,834	2,005	1,484	2,287
0,05	118,089	38,044	218,534	2,072	1,580	2,340
0,06	134,644	45,912	242,076	2,129	1,662	2,384
0,07	151,059	54,127	264,848	2,179	1,733	2,423
0,08	167,447	62,712	287,101	2,224	1,797	2,458
0,09	183,890	71,684	309,010	2,265	1,855	2,490
0,1	200,449	81,061	330,705	2,302	1,909	2,519
0,15	286,447	134,569	438,889	2,457	2,129	2,642
0,2	380,422	200,625	551,514	2,580	2,302	2,742
0,25	485,265	281,487	673,576	2,686	2,449	2,828
0,3	603,827	379,674	810,000	2,781	2,579	2,908
0,35	739,405	497,841	967,052	2,869	2,697	2,985
0,4	896,102	638,468	1153,720	2,952	2,805	3,062
0,45	1079,246	803,452	1383,495	3,033	2,905	3,141

0,5	1295,994	994,018	1676,516	3,113	2,997	3,224
0,55	1556,271	1211,682	2061,951	3,192	3,083	3,314
0,6	1874,340	1460,451	2581,533	3,273	3,164	3,412
0,65	2271,555	1749,301	3297,607	3,356	3,243	3,518
0,7	2781,591	2094,553	4311,381	3,444	3,321	3,635
0,75	3461,200	2524,020	5803,192	3,539	3,402	3,764
0,8	4415,090	3087,252	8129,998	3,645	3,490	3,910
0,85	5863,554	3883,744	12107,493	3,768	3,589	4,083
0,9	8379,178	5158,558	20082,732	3,923	3,713	4,303
0,91	9133,735	5521,532	22706,363	3,961	3,742	4,356
0,92	10030,660	5943,722	25951,387	4,001	3,774	4,414
0,93	11118,866	6443,993	30063,313	4,046	3,809	4,478
0,94	12474,353	7051,105	35438,222	4,096	3,848	4,549
0,95	14223,120	7811,724	42761,255	4,153	3,893	4,631
0,96	16593,397	8808,312	53335,774	4,220	3,945	4,727
0,97	20055,342	10205,764	70008,873	4,302	4,009	4,845
0,98	25800,411	12406,413	100555,469	4,412	4,094	5,002
0,99	38375,066	16862,609	178087,377	4,584	4,227	5,251

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	40,625	7,761	97,725	1,609	,890	1,990
0,02	61,256	14,074	134,086	1,787	1,148	2,127

0,03	79,490	20,521	163,978	1,900	1,312	2,215
0,04	96,704	27,242	190,851	1,985	1,435	2,281
0,05	113,420	34,293	215,988	2,055	1,535	2,334
0,06	129,905	41,705	240,033	2,114	1,620	2,380
0,07	146,320	49,501	263,363	2,165	1,695	2,421
0,08	162,771	57,698	286,226	2,212	1,761	2,457
0,09	179,332	66,315	308,793	2,254	1,822	2,490
0,1	196,063	75,367	331,191	2,292	1,877	2,520
0,15	283,645	127,726	443,573	2,453	2,106	2,647
0,2	380,399	193,526	561,602	2,580	2,287	2,749
0,25	489,319	275,244	690,516	2,690	2,440	2,839
0,3	613,472	375,695	835,660	2,788	2,575	2,922
0,35	756,474	497,883	1003,976	2,879	2,697	3,002
0,4	922,877	644,669	1205,530	2,965	2,809	3,081
0,45	1118,633	818,326	1455,545	3,049	2,913	3,163
0,5	1351,784	1020,427	1776,917	3,131	3,009	3,250
0,55	1633,529	1252,864	2203,141	3,213	3,098	3,343
0,6	1980,026	1520,216	2782,775	3,297	3,182	3,444
0,65	2415,575	1832,483	3589,282	3,383	3,263	3,555
0,7	2978,652	2207,830	4743,150	3,474	3,344	3,676
0,75	3734,413	2677,358	6461,000	3,572	3,428	3,810
0,8	4803,697	3296,773	9175,739	3,682	3,518	3,963
0,85	6442,289	4178,509	13887,790	3,809	3,621	4,143
0,9	9320,082	5601,000	23516,486	3,969	3,748	4,371
0,91	10189,579	6008,138	26722,610	4,008	3,779	4,427
0,92	11226,340	6482,734	30709,100	4,050	3,812	4,487
0,93	12488,480	7046,446	35789,906	4,097	3,848	4,554
0,94	14066,545	7732,357	42474,146	4,148	3,888	4,628

0,95	16111,142	8594,264	51647,639	4,207	3,934	4,713
0,96	18896,090	9727,466	65006,863	4,276	3,988	4,813
0,97	22987,970	11323,097	86287,526	4,362	4,054	4,936
0,98	29830,762	13849,295	125796,177	4,475	4,141	5,100
0,99	44980,514	19005,386	228093,060	4,653	4,279	5,358

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for					
	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for $\log(\text{konsentrasi})^a$		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	44,901	7,961	108,295	1,652	,901	2,035
0,02	66,933	14,426	146,645	1,826	1,159	2,166
0,03	86,228	21,025	177,834	1,936	1,323	2,250
0,04	104,329	27,904	205,666	2,018	1,446	2,313
0,05	121,820	35,118	231,548	2,086	1,546	2,365
0,06	139,000	42,701	256,184	2,143	1,630	2,409
0,07	156,046	50,676	279,988	2,193	1,705	2,447
0,08	173,075	59,062	303,226	2,238	1,771	2,482
0,09	190,170	67,877	326,084	2,279	1,832	2,513
0,1	207,395	77,137	348,701	2,317	1,887	2,542
0,15	296,965	130,708	461,260	2,473	2,116	2,664
0,2	395,017	198,059	578,159	2,597	2,297	2,762
0,25	504,568	281,738	704,700	2,703	2,450	2,848
0,3	628,614	384,614	846,177	2,798	2,585	2,927
0,35	770,630	509,655	1009,493	2,887	2,707	3,004

0,4	934,948	659,437	1204,861	2,971	2,819	3,081
0,45	1127,202	835,444	1448,074	3,052	2,922	3,161
0,5	1354,967	1037,829	1763,138	3,132	3,016	3,246
0,55	1628,754	1266,815	2184,752	3,212	3,103	3,339
0,6	1963,677	1525,777	2761,996	3,293	3,183	3,441
0,65	2382,383	1823,965	3568,022	3,377	3,261	3,552
0,7	2920,609	2178,441	4722,712	3,465	3,338	3,674
0,75	3638,628	2617,823	6442,194	3,561	3,418	3,809
0,8	4647,738	3192,521	9159,014	3,667	3,504	3,962
0,85	6182,325	4003,185	13872,996	3,791	3,602	4,142
0,9	8852,363	5296,961	23500,837	3,947	3,724	4,371
0,91	9654,184	5664,642	26705,597	3,985	3,753	4,427
0,92	10607,769	6091,968	30689,777	4,026	3,785	4,487
0,93	11765,359	6597,887	35766,765	4,071	3,819	4,553
0,94	13208,151	7211,264	42444,667	4,121	3,858	4,628
0,95	15070,838	7978,897	51607,365	4,178	3,902	4,713
0,96	17597,546	8983,406	64947,205	4,245	3,953	4,813
0,97	21291,535	10389,820	86189,691	4,328	4,017	4,935
0,98	27429,327	12600,234	125609,222	4,438	4,100	5,099
0,99	40888,545	17063,160	227600,956	4,612	4,232	5,357

a. Logarithm base = 10.

b. IC₅₀ Ekstrak Metanol Liken *P. cetrata* terhadap *P. aeruginosa*

Uji aktivitas antibakteri	IC ₅₀ (µg/mL)	Rerata (µg/mL)	SD (µg/mL)	CV (%)
Replikasi 1	1295,994			
Replikasi 2	1351,784	1334,248	33,167	2,486
Replikasi 3	1354,967			

2. Penentuan IC_{50} Fraksi Heksana Liken *P. cetrata* terhadap *P. aeruginosa* menggunakan Analisis Probit

a. Data Hasil Analisis Probit

Replikasi 1

Probability	Confidence Limits					
	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for $\log(\text{konsentrasi})^a$		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	35,822	7,577	83,352	1,554	,880	1,921
0,02	53,735	13,505	114,184	1,730	1,130	2,058
0,03	69,500	19,476	139,489	1,842	1,290	2,145
0,04	84,341	25,644	162,209	1,926	1,409	2,210
0,05	98,721	32,069	183,439	1,994	1,506	2,263
0,06	112,876	38,782	203,726	2,053	1,589	2,309
0,07	126,948	45,807	223,392	2,104	1,661	2,349
0,08	141,030	53,161	242,646	2,149	1,726	2,385
0,09	155,189	60,861	261,635	2,191	1,784	2,418
0,1	169,475	68,920	280,467	2,229	1,838	2,448
0,15	244,038	115,109	374,712	2,387	2,061	2,574
0,2	326,069	172,488	473,251	2,513	2,237	2,675
0,25	418,099	243,139	580,327	2,621	2,386	2,764
0,3	522,684	329,441	700,150	2,718	2,518	2,845
0,35	642,816	433,972	838,094	2,808	2,637	2,923
0,4	782,247	559,252	1001,903	2,893	2,748	3,001
0,45	945,869	707,353	1203,314	2,976	2,850	3,080
0,5	1140,276	879,689	1460,121	3,057	2,944	3,164

0,55	1374,641	1077,758	1798,455	3,138	3,033	3,255
0,6	1662,174	1305,197	2255,934	3,221	3,116	3,353
0,65	2022,709	1570,290	2888,696	3,306	3,196	3,461
0,7	2487,605	1888,363	3787,753	3,396	3,276	3,578
0,75	3109,865	2285,725	5115,459	3,493	3,359	3,709
0,8	3987,596	2809,426	7193,969	3,601	3,449	3,857
0,85	5327,985	3554,260	10761,652	3,727	3,551	4,032
0,9	7672,084	4754,719	17950,867	3,885	3,677	4,254
0,91	8378,374	5098,090	20323,383	3,923	3,707	4,308
0,92	9219,540	5498,243	23261,835	3,965	3,740	4,367
0,93	10242,246	5973,394	26990,864	4,010	3,776	4,431
0,94	11519,118	6551,354	31873,362	4,061	3,816	4,503
0,95	13170,807	7277,339	38537,986	4,120	3,862	4,586
0,96	15416,361	8231,417	48182,701	4,188	3,915	4,683
0,97	18708,263	9574,118	63429,703	4,272	3,981	4,802
0,98	24197,216	11698,425	91458,383	4,384	4,068	4,961
0,99	36296,837	16029,841	162961,213	4,560	4,205	5,212

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for $\log(\text{konsentrasi})^a$		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	34,750	7,156	81,640	1,541	,855	1,912
0,02	52,558	12,933	112,488	1,721	1,112	2,051
0,03	68,336	18,818	137,925	1,835	1,275	2,140

0,04	83,255	24,943	160,838	1,920	1,397	2,206
0,05	97,763	31,361	182,304	1,990	1,496	2,261
0,06	112,086	38,100	202,861	2,050	1,581	2,307
0,07	126,362	45,182	222,828	2,102	1,655	2,348
0,08	140,680	52,624	242,410	2,148	1,721	2,385
0,09	155,106	60,441	261,753	2,191	1,781	2,418
0,1	169,689	68,649	280,964	2,230	1,837	2,449
0,15	246,166	116,061	377,491	2,391	2,065	2,577
0,2	330,860	175,555	479,031	2,520	2,244	2,680
0,25	426,396	249,369	590,039	2,630	2,397	2,771
0,3	535,486	340,035	715,111	2,729	2,532	2,854
0,35	661,342	450,218	860,289	2,820	2,653	2,935
0,4	808,016	582,366	1034,453	2,907	2,765	3,015
0,45	980,815	738,239	1251,172	2,992	2,868	3,097
0,5	1186,916	918,843	1530,866	3,074	2,963	3,185
0,55	1436,325	1125,616	1903,060	3,157	3,051	3,279
0,6	1743,492	1362,850	2409,914	3,241	3,134	3,382
0,65	2130,167	1640,054	3114,806	3,328	3,215	3,493
0,7	2630,824	1974,125	4121,779	3,420	3,295	3,615
0,75	3303,900	2393,538	5618,136	3,519	3,379	3,750
0,8	4257,903	2949,036	7978,087	3,629	3,470	3,902
0,85	5722,833	3743,046	12065,278	3,758	3,573	4,082
0,9	8302,079	5029,768	20395,018	3,919	3,702	4,310
0,91	9082,645	5399,068	23163,965	3,958	3,732	4,365
0,92	10014,014	5830,037	26604,334	4,001	3,766	4,425
0,93	11148,712	6342,550	30985,559	4,047	3,802	4,491
0,94	12568,633	6966,986	36744,235	4,099	3,843	4,565
0,95	14410,086	7752,801	44639,362	4,159	3,889	4,650

0,96	16921,103	8787,705	56123,109	4,228	3,944	4,749
0,97	20615,427	10247,862	74389,446	4,314	4,011	4,872
0,98	26804,034	12565,529	108237,008	4,428	4,099	5,034
0,99	40540,641	17313,957	195621,500	4,608	4,238	5,291

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi					
	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for $\log(\text{konsentrasi})^a$		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	35,884	6,414	87,614	1,555	,807	1,943
0,02	54,073	11,720	119,826	1,733	1,069	2,079
0,03	70,141	17,173	146,227	1,846	1,235	2,165
0,04	85,303	22,884	169,909	1,931	1,360	2,230
0,05	100,023	28,896	192,021	2,000	1,461	2,283
0,06	114,537	35,236	213,138	2,059	1,547	2,329
0,07	128,985	41,921	233,598	2,111	1,622	2,368
0,08	143,463	48,969	253,620	2,157	1,690	2,404
0,09	158,035	56,393	273,359	2,199	1,751	2,437
0,1	172,755	64,210	292,926	2,237	1,808	2,467
0,15	249,779	109,685	390,763	2,398	2,040	2,592
0,2	334,825	167,320	492,951	2,525	2,224	2,693
0,25	430,525	239,465	603,957	2,634	2,379	2,781
0,3	539,567	328,839	728,267	2,732	2,517	2,862
0,35	665,121	438,381	871,733	2,823	2,642	2,940
0,4	811,174	570,862	1043,023	2,909	2,757	3,018

0,45	982,937	728,246	1255,683	2,993	2,862	3,099
0,5	1187,450	911,261	1530,714	3,075	2,960	3,185
0,55	1434,514	1120,347	1899,167	3,157	3,049	3,279
0,6	1738,267	1358,467	2405,468	3,240	3,133	3,381
0,65	2119,969	1634,078	3115,772	3,326	3,213	3,494
0,7	2613,273	1963,277	4138,258	3,417	3,293	3,617
0,75	3275,156	2373,446	5668,216	3,515	3,375	3,753
0,8	4211,261	2913,112	8097,762	3,624	3,464	3,908
0,85	5645,145	3679,627	12336,997	3,752	3,566	4,091
0,9	8162,080	4913,330	21054,284	3,912	3,691	4,323
0,91	8922,285	5265,902	23968,441	3,950	3,721	4,380
0,92	9828,595	5676,629	27598,132	3,992	3,754	4,441
0,93	10931,748	6164,143	32232,878	4,039	3,790	4,508
0,94	12310,784	6756,880	38342,950	4,090	3,830	4,584
0,95	14097,151	7501,057	46748,085	4,149	3,875	4,670
0,96	16529,792	8478,482	59021,528	4,218	3,928	4,771
0,97	20103,023	9853,083	78636,372	4,303	3,994	4,896
0,98	26076,305	12025,914	115205,369	4,416	4,080	5,061
0,99	39293,789	16450,383	210484,873	4,594	4,216	5,323

a. Logarithm base = 10.

b. IC₅₀ Fraksi Heksana Liken *P. cetrata* terhadap *P. aeruginosa*

Uji aktivitas antibakteri	IC ₅₀ (µg/mL)	Rerata (µg/mL)	SD (µg/mL)	CV (%)
Replikasi 1	1140,276			
Replikasi 2	1186,916	1171,547	27,083	2,312
Replikasi 3	1187,450			

3. Penentuan IC_{50} Fraksi Diklorometana Liken *P. cetrata* terhadap *P. aeruginosa* menggunakan Analisis Probit

a. Data Hasil Analisis Probit

Replikasi 1

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for $\log(\text{konsentrasi})^a$		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	11,172	1,116	38,934	1,048	,048	1,590
0,02	18,989	2,383	58,789	1,278	,377	1,769
0,03	26,586	3,854	76,413	1,425	,586	1,883
0,04	34,247	5,530	93,117	1,535	,743	1,969
0,05	42,078	7,415	109,403	1,624	,870	2,039
0,06	50,140	9,515	125,527	1,700	,978	2,099
0,07	58,470	11,838	141,643	1,767	1,073	2,151
0,08	67,097	14,392	157,857	1,827	1,158	2,198
0,09	76,042	17,186	174,245	1,881	1,235	2,241
0,1	85,328	20,232	190,865	1,931	1,306	2,281
0,15	137,481	39,660	278,986	2,138	1,598	2,446
0,2	200,855	67,465	378,620	2,303	1,829	2,578
0,25	278,053	106,018	493,888	2,444	2,025	2,694
0,3	372,366	158,426	629,676	2,571	2,200	2,799
0,35	488,100	228,731	792,541	2,689	2,359	2,899
0,4	631,018	322,143	991,853	2,800	2,508	2,996
0,45	809,004	445,304	1241,626	2,908	2,649	3,094
0,5	1033,116	606,570	1563,659	3,014	2,783	3,194

0,55	1319,312	816,371	1993,015	3,120	2,912	3,300
0,6	1691,441	1087,966	2587,820	3,228	3,037	3,413
0,65	2186,702	1439,456	3447,458	3,340	3,158	3,537
0,7	2866,345	1898,734	4749,376	3,457	3,278	3,677
0,75	3838,585	2514,297	6833,148	3,584	3,400	3,835
0,8	5313,939	3379,296	10421,589	3,725	3,529	4,018
0,85	7763,462	4694,954	17317,289	3,890	3,672	4,238
0,9	12508,598	6992,104	33318,228	4,097	3,845	4,523
0,91	14035,969	7684,561	39092,481	4,147	3,886	4,592
0,92	15907,331	8509,682	46532,674	4,202	3,930	4,668
0,93	18254,227	9513,587	56393,414	4,261	3,978	4,751
0,94	21286,921	10768,132	69943,198	4,328	4,032	4,845
0,95	25365,352	12392,813	89480,298	4,404	4,093	4,952
0,96	31166,036	14604,849	119616,777	4,494	4,164	5,078
0,97	40145,556	17853,585	171092,863	4,604	4,252	5,233
0,98	56208,853	23283,754	275733,405	4,750	4,367	5,440
0,99	95539,372	35296,798	586463,574	4,980	4,548	5,768

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for $\log(\text{konsentrasi})^a$		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	12,624	1,468	41,226	1,101	,167	1,615
0,02	21,142	3,047	61,660	1,325	,484	1,790
0,03	29,325	4,839	79,659	1,467	,685	1,901

0,04	37,508	6,851	96,629	1,574	,836	1,985
0,05	45,822	9,086	113,105	1,661	,958	2,053
0,06	54,335	11,552	129,360	1,735	1,063	2,112
0,07	63,091	14,255	145,559	1,800	1,154	2,163
0,08	72,121	17,205	161,813	1,858	1,236	2,209
0,09	81,452	20,409	178,201	1,911	1,310	2,251
0,1	91,105	23,880	194,785	1,960	1,378	2,290
0,15	144,850	45,650	282,207	2,161	1,659	2,451
0,2	209,395	76,125	380,275	2,321	1,882	2,580
0,25	287,258	117,609	492,989	2,458	2,070	2,693
0,3	381,573	173,095	625,009	2,582	2,238	2,796
0,35	496,407	246,430	782,532	2,696	2,392	2,894
0,4	637,178	342,504	974,377	2,804	2,535	2,989
0,45	811,261	467,461	1213,687	2,909	2,670	3,084
<u>0,5</u>	<u>1028,957</u>	628,904	1520,801	3,012	2,799	3,182
0,55	1305,071	836,201	1928,196	3,116	2,922	3,285
0,6	1661,629	1101,214	2489,138	3,221	3,042	3,396
0,65	2132,830	1440,312	3293,532	3,329	3,158	3,518
0,7	2774,707	1879,122	4499,742	3,443	3,274	3,653
0,75	3685,722	2462,536	6407,001	3,567	3,391	3,807
0,8	5056,255	3276,587	9644,278	3,704	3,515	3,984
0,85	7309,311	4506,065	15758,274	3,864	3,654	4,198
0,9	11621,244	6635,330	29638,421	4,065	3,822	4,472
0,91	12998,435	7273,821	34578,868	4,114	3,862	4,539
0,92	14680,138	8032,946	40905,606	4,167	3,905	4,612
0,93	16781,452	8954,314	49234,133	4,225	3,952	4,692
0,94	19485,765	10102,618	60592,600	4,290	4,004	4,782
0,95	23105,878	11585,201	76830,656	4,364	4,064	4,886

0,96	28227,268	13596,679	101629,848	4,451	4,133	5,007
0,97	36104,252	16538,378	143479,910	4,558	4,218	5,157
0,98	50078,271	21428,630	227224,424	4,700	4,331	5,356
0,99	83869,159	32160,145	470048,596	4,924	4,507	5,672

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Confidence Limits						
Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	9,887	,855	36,735	,995	-,068	1,565
0,02	17,136	1,889	56,236	1,234	,276	1,750
0,03	24,290	3,120	73,740	1,385	,494	1,868
0,04	31,580	4,548	90,459	1,499	,658	1,956
0,05	39,097	6,178	106,860	1,592	,791	2,029
0,06	46,888	8,016	123,181	1,671	,904	2,091
0,07	54,986	10,069	139,569	1,740	1,003	2,145
0,08	63,418	12,347	156,122	1,802	1,092	2,193
0,09	72,204	14,859	172,913	1,859	1,172	2,238
0,1	81,363	17,618	190,000	1,910	1,246	2,279
0,15	133,406	35,568	281,405	2,125	1,551	2,449
0,2	197,629	61,915	386,048	2,296	1,792	2,587
0,25	276,869	99,207	508,428	2,442	1,997	2,706
0,3	374,772	150,809	654,047	2,574	2,178	2,816
0,35	496,153	221,129	830,402	2,696	2,345	2,919
0,4	647,497	315,901	1048,312	2,811	2,500	3,020

0,45	837,729	442,501	1324,078	2,923	2,646	3,122
0,5	1079,432	610,305	1683,213	3,033	2,786	3,226
0,55	1390,872	831,145	2167,040	3,143	2,920	3,336
0,6	1799,504	1120,227	2844,619	3,255	3,049	3,454
0,65	2348,415	1498,444	3835,274	3,371	3,176	3,584
0,7	3109,016	1997,970	5354,836	3,493	3,301	3,729
0,75	4208,393	2674,578	7822,444	3,624	3,427	3,893
0,8	5895,766	3635,420	12144,445	3,771	3,561	4,084
0,85	8734,043	5113,011	20620,882	3,941	3,709	4,314
0,9	14320,676	7725,368	40807,502	4,156	3,888	4,611
0,91	16137,331	8519,045	48212,347	4,208	3,930	4,683
0,92	18372,974	9467,891	57824,026	4,264	3,976	4,762
0,93	21190,287	10626,453	70666,098	4,326	4,026	4,849
0,94	24850,407	12079,964	88472,245	4,395	4,082	4,947
0,95	29802,499	13970,626	114410,457	4,474	4,145	5,058
0,96	36895,429	16557,910	154900,946	4,567	4,219	5,190
0,97	47968,911	20380,970	225071,682	4,681	4,309	5,352
0,98	67996,431	26821,174	370428,353	4,832	4,428	5,569
0,99	1,178E5	41234,185	814571,036	5,071	4,615	5,911

a. Logarithm base = 10.

b. IC₅₀ Fraksi Diklorometana Liken *P. cetrata* terhadap *P. aeruginosa*

Uji aktivitas antibakteri	IC ₅₀ (µg/mL)	Rerata (µg/mL)	SD (µg/mL)	CV (%)
Replikasi 1	1033,116			
Replikasi 2	1028,957	1047,168	28,018	2,676
Replikasi 3	1079,432			

4. Penentuan IC_{50} Fraksi Etil Asetat Liken *P. cetrata* terhadap *P. aeruginosa* menggunakan Analisis Probit

a. Data Hasil Analisis Probit

Replikasi 1

Probability	Confidence Limits					
	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for $\log(\text{konsentrasi})^a$		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	28,425	3,870	70,426	1,454	,588	1,848
0,02	42,929	7,511	95,307	1,633	,876	1,979
0,03	55,763	11,433	115,557	1,746	1,058	2,063
0,04	67,889	15,674	133,644	1,832	1,195	2,126
0,05	79,673	20,252	150,483	1,901	1,306	2,177
0,06	91,301	25,179	166,535	1,960	1,401	2,222
0,07	102,885	30,467	182,068	2,012	1,484	2,260
0,08	114,499	36,128	197,258	2,059	1,558	2,295
0,09	126,196	42,172	212,229	2,101	1,625	2,327
0,1	138,016	48,613	227,073	2,140	1,687	2,356
0,15	199,951	87,232	301,560	2,301	1,941	2,479
0,2	268,458	137,868	380,466	2,429	2,139	2,580
0,25	345,660	202,337	468,650	2,539	2,306	2,671
0,3	433,739	281,981	572,305	2,637	2,450	2,758
0,35	535,274	376,801	701,002	2,729	2,576	2,846
0,4	653,517	484,822	869,560	2,815	2,686	2,939
0,45	792,722	603,216	1098,659	2,899	2,780	3,041
0,5	958,641	731,116	1414,779	2,982	2,864	3,151

0,55	1159,286	871,068	1853,369	3,064	2,940	3,268
0,6	1406,225	1028,482	2467,578	3,148	3,012	3,392
0,65	1716,861	1211,307	3343,980	3,235	3,083	3,524
0,7	2118,767	1431,102	4632,676	3,326	3,156	3,666
0,75	2658,657	1706,042	6613,568	3,425	3,232	3,820
0,8	3423,218	2067,877	9863,809	3,534	3,316	3,994
0,85	4596,081	2580,146	15763,675	3,662	3,412	4,198
0,9	6658,584	3399,123	28514,555	3,823	3,531	4,455
0,91	7282,272	3631,948	32914,156	3,862	3,560	4,517
0,92	8026,203	3902,536	38470,775	3,905	3,591	4,585
0,93	8932,208	4222,865	45674,901	3,951	3,626	4,660
0,94	10065,487	4611,173	55334,218	4,003	3,664	4,743
0,95	11534,521	5097,021	68878,439	4,062	3,707	4,838
0,96	13536,630	5732,580	89100,556	4,132	3,758	4,950
0,97	16480,314	6622,007	122298,363	4,217	3,821	5,087
0,98	21407,352	8018,937	186379,259	4,331	3,904	5,270
0,99	32330,066	10836,269	362282,707	4,510	4,035	5,559

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for					
	95% Confidence Limits for konsentrasi			log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	22,652	2,037	63,484	1,355	,309	1,803
0,02	35,159	4,262	87,131	1,546	,630	1,940
0,03	46,470	6,804	106,593	1,667	,833	2,028

0,04	57,319	9,668	124,109	1,758	,985	2,094
0,05	67,987	12,861	140,513	1,832	1,109	2,148
0,06	78,617	16,392	156,226	1,896	1,215	2,194
0,07	89,296	20,271	171,495	1,951	1,307	2,234
0,08	100,084	24,510	186,481	2,000	1,389	2,271
0,09	111,023	29,122	201,300	2,045	1,464	2,304
0,1	122,146	34,122	216,036	2,087	1,533	2,335
0,15	181,366	65,516	290,511	2,259	1,816	2,463
0,2	248,314	109,290	370,109	2,395	2,039	2,568
0,25	325,132	168,046	459,584	2,512	2,225	2,662
0,3	414,172	244,260	565,171	2,617	2,388	2,752
0,35	518,312	339,292	696,944	2,715	2,531	2,843
0,4	641,245	452,041	871,742	2,807	2,655	2,940
0,45	787,870	579,035	1115,448	2,896	2,763	3,047
<u>0,5</u>	<u>964,865</u>	717,664	1463,592	2,984	2,856	3,165
0,55	1181,623	869,439	1964,665	3,072	2,939	3,293
0,6	1451,807	1040,014	2692,017	3,162	3,017	3,430
0,65	1796,148	1238,380	3767,537	3,254	3,093	3,576
0,7	2247,775	1477,733	5408,212	3,352	3,170	3,733
0,75	2863,348	1778,809	8030,836	3,457	3,250	3,905
0,8	3749,141	2177,892	12523,777	3,574	3,338	4,098
0,85	5133,065	2747,927	21094,442	3,710	3,439	4,324
0,9	7621,767	3669,568	40785,374	3,882	3,565	4,611
0,91	8385,352	3933,564	47844,356	3,924	3,595	4,680
0,92	9301,824	4241,361	56911,778	3,969	3,628	4,755
0,93	10425,563	4607,015	68887,278	4,018	3,663	4,838
0,94	11841,816	5051,991	85277,472	4,073	3,703	4,931
0,95	13693,349	5611,195	108800,344	4,137	3,749	5,037

0,96	16241,792	6346,451	144882,833	4,211	3,803	5,161
0,97	20033,659	7381,747	206085,616	4,302	3,868	5,314
0,98	26478,713	9020,721	329332,543	4,423	3,955	5,518
0,99	41098,231	12365,348	689921,899	4,614	4,092	5,839

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi					
	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	22,144	2,428	59,718	1,345	,385	1,776
0,02	34,254	4,930	82,130	1,535	,693	1,915
0,03	45,177	7,722	100,604	1,655	,888	2,003
0,04	55,634	10,818	117,248	1,745	1,034	2,069
0,05	65,901	14,225	132,849	1,819	1,153	2,123
0,06	76,120	17,952	147,800	1,881	1,254	2,170
0,07	86,376	22,010	162,337	1,936	1,343	2,210
0,08	96,726	26,408	176,610	1,986	1,422	2,247
0,09	107,212	31,158	190,728	2,030	1,494	2,280
0,1	117,866	36,273	204,772	2,071	1,560	2,311
0,15	174,480	67,821	275,779	2,242	1,831	2,441
0,2	238,308	110,810	351,648	2,377	2,045	2,546
0,25	311,383	167,464	436,748	2,493	2,224	2,640
0,3	395,920	239,908	536,649	2,598	2,380	2,730
0,35	494,615	329,385	660,084	2,694	2,518	2,820
0,4	610,926	435,263	821,281	2,786	2,639	2,914

0,45	749,429	555,086	1041,855	2,875	2,744	3,018
0,5	916,357	686,995	1351,532	2,962	2,837	3,131
0,55	1120,467	832,449	1790,747	3,049	2,920	3,253
0,6	1374,486	996,637	2419,800	3,138	2,999	3,384
0,65	1697,703	1188,060	3337,477	3,230	3,075	3,523
0,7	2120,909	1419,421	4717,521	3,327	3,152	3,674
0,75	2696,707	1710,842	6889,650	3,431	3,233	3,838
0,8	3523,627	2097,643	10547,338	3,547	3,322	4,023
0,85	4812,647	2650,938	17387,389	3,682	3,423	4,240
0,9	7124,275	3547,069	32721,748	3,853	3,550	4,515
0,91	7832,258	3804,051	38135,627	3,894	3,580	4,581
0,92	8681,342	4103,815	45042,936	3,939	3,613	4,654
0,93	9721,578	4460,114	54098,175	3,988	3,649	4,733
0,94	11031,372	4893,957	66390,028	4,043	3,690	4,822
0,95	12741,923	5439,528	83867,634	4,105	3,736	4,924
0,96	15093,444	6157,405	110388,840	4,179	3,789	5,043
0,97	18587,152	7169,158	154789,641	4,269	3,855	5,190
0,98	24514,130	8772,754	242700,416	4,389	3,943	5,385
0,99	37920,346	12050,928	493427,532	4,579	4,081	5,693

a. Logarithm base = 10.

b. IC₅₀ Fraksi Etil Asetat Liken *P. cetrata* terhadap *P. aeruginosa*

Uji aktivitas antibakteri	IC ₅₀ (µg/mL)	Rerata (µg/mL)	SD (µg/mL)	CV (%)
Replikasi 1	958,641			
Replikasi 2	964,865	946,621	26,393	2,788
Replikasi 3	916,357			

5. Penentuan IC_{50} Residu Liken *P. cetrata* terhadap *P. aeruginosa* menggunakan Analisis Probit

a. Data Hasil Analisis Probit

Replikasi 1

Probability	Confidence Limits					
	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for $\log(\text{konsentrasi})^a$		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	141,522	42,024	276,544	2,151	1,623	2,442
0,02	199,425	68,221	361,525	2,300	1,834	2,558
0,03	247,906	92,723	428,752	2,394	1,967	2,632
0,04	291,999	116,757	487,618	2,465	2,067	2,688
0,05	333,589	140,794	541,566	2,523	2,149	2,734
0,06	373,623	165,075	592,302	2,572	2,218	2,773
0,07	412,659	189,745	640,820	2,616	2,278	2,807
0,08	451,060	214,906	687,759	2,654	2,332	2,837
0,09	489,079	240,631	733,562	2,689	2,381	2,865
0,1	526,901	266,977	778,551	2,722	2,426	2,891
0,15	717,246	409,522	998,459	2,856	2,612	2,999
0,2	916,472	573,086	1221,594	2,962	2,758	3,087
0,25	1130,952	761,055	1459,108	3,053	2,881	3,164
0,3	1366,019	976,234	1721,377	3,135	2,990	3,236
0,35	1627,249	1220,606	2021,077	3,211	3,087	3,306
0,4	1921,179	1494,951	2375,419	3,284	3,175	3,376
0,45	2255,998	1799,052	2807,970	3,353	3,255	3,448
0,5	2642,429	2133,258	3349,925	3,422	3,329	3,525

0,55	3095,053	2501,116	4041,912	3,491	3,398	3,607
0,6	3634,453	2911,602	4939,214	3,560	3,464	3,694
0,65	4290,944	3380,571	6123,628	3,633	3,529	3,787
0,7	5111,518	3933,091	7726,686	3,709	3,595	3,888
0,75	6173,944	4609,332	9977,360	3,791	3,664	3,999
0,8	7618,821	5478,983	13314,045	3,882	3,739	4,124
0,85	9735,054	6679,490	18698,489	3,988	3,825	4,272
0,9	13251,880	8542,714	28760,768	4,122	3,932	4,459
0,91	14276,701	9062,298	31924,995	4,155	3,957	4,504
0,92	15480,042	9661,355	35762,961	4,190	3,985	4,553
0,93	16920,576	10364,394	40523,389	4,228	4,016	4,608
0,94	18688,453	11208,487	46600,070	4,272	4,050	4,668
0,95	20931,265	12253,270	54659,932	4,321	4,088	4,738
0,96	23912,510	13603,051	65941,099	4,379	4,134	4,819
0,97	28165,626	15463,892	83070,338	4,450	4,189	4,919
0,98	35012,799	18330,826	112958,972	4,544	4,263	5,053
0,99	49338,075	23950,669	183474,379	4,693	4,379	5,264

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for					
	95% Confidence Limits for konsentrasi			log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	150,658	52,698	276,688	2,178	1,722	2,442
0,02	207,042	81,447	356,169	2,316	1,911	2,552
0,03	253,313	107,311	418,248	2,404	2,031	2,621

0,04	294,819	132,011	472,123	2,470	2,121	2,674
0,05	333,548	156,204	521,148	2,523	2,194	2,717
0,06	370,495	180,222	566,978	2,569	2,256	2,754
0,07	406,242	204,266	610,572	2,609	2,310	2,786
0,08	441,168	228,469	652,545	2,645	2,359	2,815
0,09	475,531	252,924	693,320	2,677	2,403	2,841
0,1	509,524	277,704	733,204	2,707	2,444	2,865
0,15	678,129	408,177	925,958	2,831	2,611	2,967
0,2	851,102	552,683	1118,060	2,930	2,742	3,048
0,25	1034,263	714,386	1318,783	3,015	2,854	3,120
0,3	1232,108	895,908	1535,785	3,091	2,952	3,186
0,35	1449,073	1099,489	1777,564	3,161	3,041	3,250
0,4	1690,179	1326,872	2055,044	3,228	3,123	3,313
0,45	1961,568	1579,281	2383,010	3,293	3,198	3,377
<u>0,5</u>	<u>2271,166</u>	1857,946	2781,433	3,356	3,269	3,444
0,55	2629,627	2165,500	3276,876	3,420	3,336	3,515
0,6	3051,862	2507,914	3905,175	3,485	3,399	3,592
0,65	3559,649	2896,419	4717,650	3,551	3,462	3,674
0,7	4186,479	3349,757	5794,238	3,622	3,525	3,763
0,75	4987,313	3898,650	7270,816	3,698	3,591	3,862
0,8	6060,604	4596,547	9402,223	3,783	3,662	3,973
0,85	7606,502	5548,317	12735,091	3,881	3,744	4,105
0,9	10123,560	7005,111	18723,258	4,005	3,845	4,272
0,91	10847,229	7407,751	20558,579	4,035	3,870	4,313
0,92	11692,142	7870,284	22760,180	4,068	3,896	4,357
0,93	12697,327	8410,955	25458,019	4,104	3,925	4,406
0,94	13922,449	9057,280	28855,709	4,144	3,957	4,460
0,95	15464,635	9853,370	33294,035	4,189	3,994	4,522

0,96	17496,132	10876,083	39397,075	4,243	4,036	4,595
0,97	20362,886	12276,539	48467,396	4,309	4,089	4,685
0,98	24913,704	14415,618	63861,603	4,396	4,159	4,805
0,99	34237,743	18555,658	98706,769	4,535	4,268	4,994

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi					
	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for $\log(\text{konsentrasi})^a$		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0,01	126,690	37,341	250,536	2,103	1,572	2,399
0,02	178,015	60,150	327,104	2,250	1,779	2,515
0,03	220,891	81,358	387,590	2,344	1,910	2,588
0,04	259,825	102,078	440,493	2,415	2,009	2,644
0,05	296,503	122,736	488,928	2,472	2,089	2,689
0,06	331,773	143,553	534,435	2,521	2,157	2,728
0,07	366,134	164,662	577,913	2,564	2,217	2,762
0,08	399,909	186,152	619,936	2,602	2,270	2,792
0,09	433,324	208,092	660,903	2,637	2,318	2,820
0,1	466,546	230,531	701,104	2,669	2,363	2,846
0,15	633,459	351,596	896,987	2,802	2,546	2,953
0,2	807,761	490,187	1094,469	2,907	2,690	3,039
0,25	995,056	649,563	1302,849	2,998	2,813	3,115
0,3	1199,990	832,777	1530,214	3,079	2,921	3,185
0,35	1427,388	1042,639	1785,967	3,155	3,018	3,252
0,4	1682,890	1281,416	2082,697	3,226	3,108	3,319

0,45	1973,539	1550,579	2438,108	3,295	3,190	3,387
0,5	2308,548	1851,186	2876,934	3,363	3,267	3,459
0,55	2700,425	2185,510	3432,893	3,431	3,340	3,536
0,6	3166,811	2559,637	4152,077	3,501	3,408	3,618
0,65	3733,668	2985,999	5101,093	3,572	3,475	3,708
0,7	4441,198	3486,020	6384,828	3,648	3,542	3,805
0,75	5355,872	4095,200	8184,070	3,729	3,612	3,913
0,8	6597,739	4875,616	10843,392	3,819	3,688	4,035
0,85	8413,169	5949,692	15115,947	3,925	3,774	4,179
0,9	11423,095	7612,639	23052,188	4,058	3,882	4,363
0,91	12298,860	8075,814	25537,685	4,090	3,907	4,407
0,92	13326,515	8609,609	28547,021	4,125	3,935	4,456
0,93	14555,862	9235,791	32272,319	4,163	3,965	4,509
0,94	16063,378	9987,276	37017,238	4,206	3,999	4,568
0,95	17974,188	10917,003	43295,051	4,255	4,038	4,636
0,96	20511,507	12117,543	52056,490	4,312	4,083	4,716
0,97	24126,816	13771,708	65313,169	4,383	4,139	4,815
0,98	29937,858	16318,501	88339,768	4,476	4,213	4,946
0,99	42066,480	21306,102	142297,816	4,624	4,329	5,153

a. Logarithm base = 10.

b. IC₅₀ Residu Liken *P. cetrata* terhadap *P. aeruginosa*

Uji aktivitas antibakteri	IC ₅₀ (µg/mL)	Rerata (µg/mL)	SD (µg/mL)	CV (%)
Replikasi 1	2642,429			
Replikasi 2	2271,166	2407,381	204,414	8,491
Replikasi 3	2308,548			