



**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
TUMBUHAN ANYANG-ANYANG (*Elaeocarpus grandiflorus*)
TERHADAP *Escherichia coli***

SKRIPSI

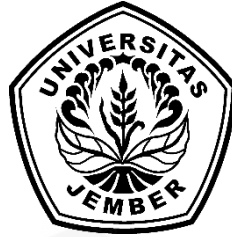
Oleh:

Ganevi Resta Savitri

NIM 152210101134

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2019



**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
TUMBUHAN ANYANG-ANYANG (*Elaeocarpus grandiflorus*)
TERHADAP *Escherichia coli***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

Ganevi Resta Savitri

NIM 152210101134

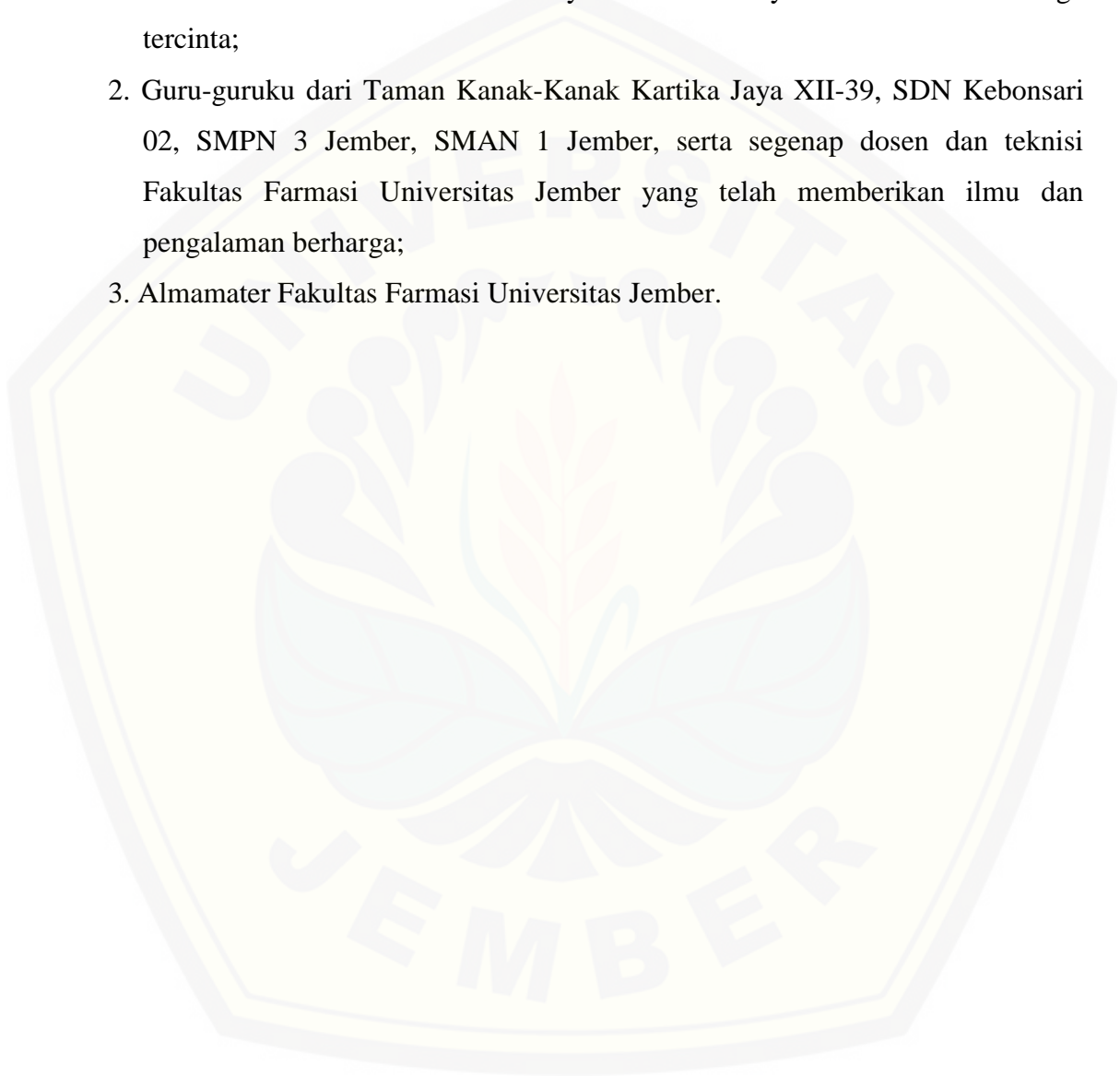
**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Sunu Dwi Astuti Rini dan ayahanda Hemansyah serta seluruh keluarga tercinta;
2. Guru-guruku dari Taman Kanak-Kanak Kartika Jaya XII-39, SDN Kebonsari 02, SMPN 3 Jember, SMAN 1 Jember, serta segenap dosen dan teknisi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan pengalaman berharga;
3. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.



MOTO

Cukuplah Allah sebagai penolong kami dan Allah adalah sebaik-baik pelindung.

(Terjemahan Surat Ali Imran ayat 173)¹⁾



¹⁾ Kementerian Agama Republik Indonesia. 2014. *Al-Quran Tajwid dan Terjemah Al-Karim*. Surakarta: Penerbit Ziyad Books

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Ganevi Resta Savitri

NIM : 152210101134

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Anyang-Anyang (*Elaeocarpus grandiflorus*) terhadap *Escherichia coli*" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 28 Juni 2019

Yang menyatakan,

Ganevi Resta Savitri

NIM 152210101134

SKRIPSI

**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
TUMBUHAN ANYANG-ANYANG (*Elaeocarpus grandiflorus*)
TERHADAP *Escherichia coli***

Oleh:

Ganevi Resta Savitri

NIM 152210101134

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Ari S. Nugraha., S.F.,GdipSc.,M.Sc-Res.,Ph.D.,Apt

Dosen Pembimbing Anggota : Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt.

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Anyang-Anyang (*Elaeocarpus grandiflorus*) terhadap *Escherichia coli*” karya Ganevi Resta Savitri telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 28 Juni 2019

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Ari S. N., S.F.,GdipSc.,M.Sc-Res.,Ph.D.,Apt.

NIP 197807212003121001

Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc.,Apt.

NIP 198201292009121003

Tim Penguji

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

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

NIP 198504282009121004

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

NIP 19760414200212201

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

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

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Anyang-Anyang (*Elaeocarpus grandiflorus* J. E. Smith.) terhadap *Escherichia coli*; Ganevi Resta Savitri: 152210101134; 2019; 98 halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember

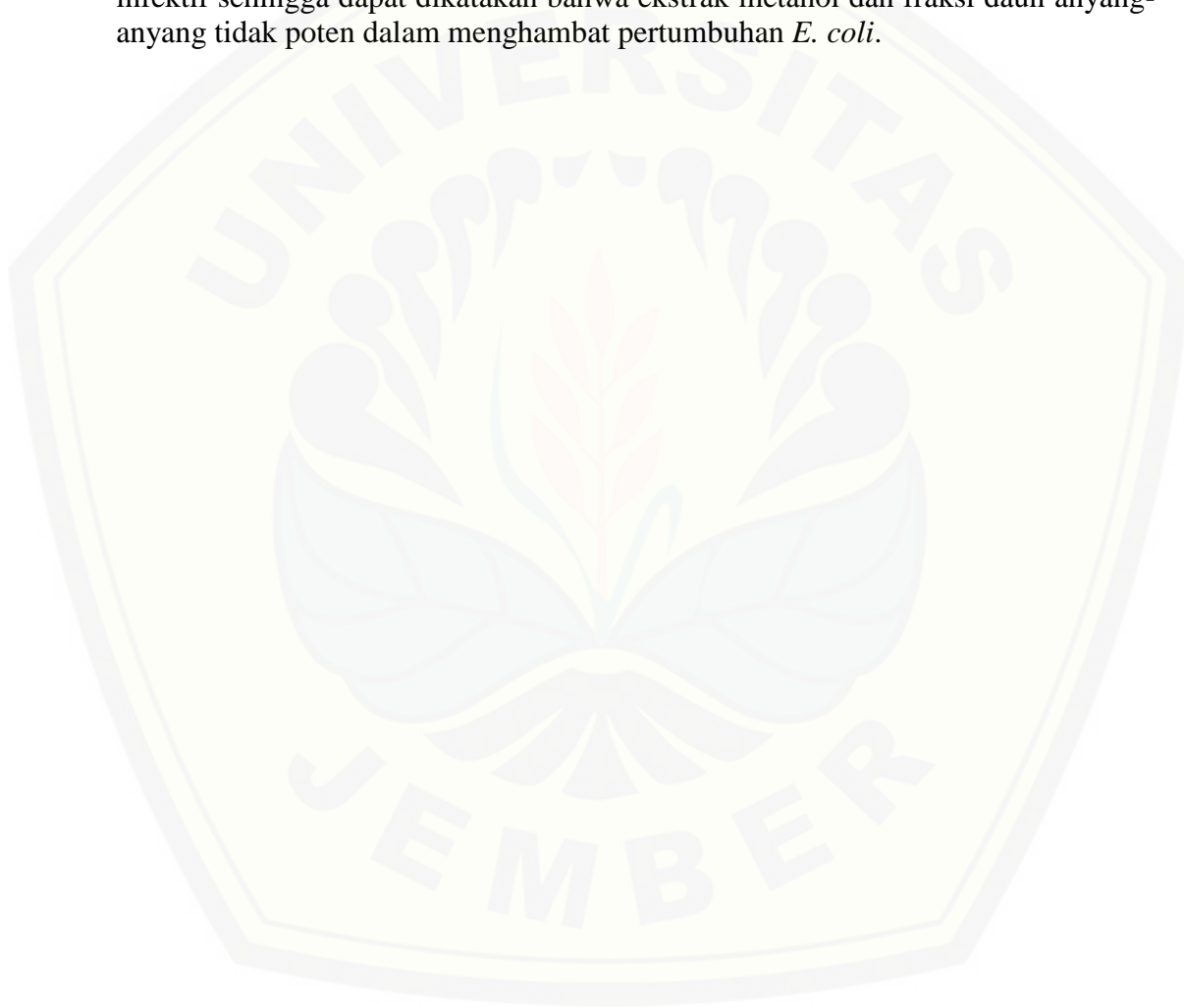
Infeksi bakteri menjadi salah satu dari penyebab kematian paling utama di dunia. Menurut *World Health Organization* (WHO) tahun 2018 terdapat 9 juta orang meninggal akibat penyakit infeksi setiap tahunnya. Penggunaan antibiotik untuk mengatasi infeksi bakteri sudah banyak mengalami resistensi. Kemampuan beradaptasi dari bakteri menjadi hal penting untuk dikembangkannya agen antibakteri baru. Pemanfaatan suatu bahan alam yang diteliti terkait aktivitas antibakterinya dapat menjadi salah satu solusi. Skrining aktivitas antibakteri dapat dilakukan terhadap bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli* (*E. coli*) karena bakteri yang banyak mengalami resistensi merupakan bakteri gram negatif. Resistensi bakteri gram negatif terkait dengan struktur dinding selnya yang memiliki permeabilitas rendah sehingga sukar ditembus oleh senyawa asing.

Penelitian aktivitas antibakteri pada tumbuhan telah banyak dilakukan salah satunya adalah tumbuhan anyang-anyang (*Elaeocarpus grandiflorus*). Tumbuhan anyang-anyang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri tersebut dapat menjadi skrining awal untuk mengetahui potensi aktivitas antibakteri tumbuhan anyang-anyang terhadap bakteri gram negatif *E. coli*. Aktivitas antibakteri suatu tumbuhan biasanya merupakan kontribusi dari fitokonstituen yang dikandungnya. Penelitian terkait metabolit sekunder dari tumbuhan anyang-anyang masih sangat jarang dilakukan. Skrining fitokimia dapat dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa apa saja yang terkandung dalam tumbuhan anyang-anyang.

Tumbuhan anyang-anyang pada penelitian ini diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol dan difraksinasi secara partisi cair-cair dengan heksana, diklorometana, etil asetat, dan air. Skrining fitokimia dilakukan pada ekstrak dan semua fraksi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun anyang-anyang mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, polifenol, dan terpenoid. Hasil skrining fitokimia fraksi daun anyang-anyang menunjukkan bahwa fraksi heksana mengandung senyawa golongan polifenol dan terpenoid, fraksi diklorometana mengandung senyawa golongan alkaloid, polifenol, dan terpenoid, fraksi etil asetat mengandung senyawa golongan polifenol, dan residu mengandung senyawa golongan flavonoid dan polifenol.

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap ekstrak dan fraksi daun anyang-anyang menggunakan metode mikrodilusi dengan mengacu pada protokol *Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI)*. Pengujian dilakukan terhadap bakteri *E. coli* yang diinkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C. Gentamisin digunakan sebagai kontrol positif untuk memastikan bahwa metode yang dilakukan sudah benar.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* menunjukkan bahwa persentase penghambatan antibakteri oleh gentamisin telah memenuhi nilai yang disyaratkan yakni memiliki konsentrasi hambat minimum (*Minimum Inhibitory Concentration/MIC*) $\leq 4 \mu\text{g/mL}$. Uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki IC_{50} sebesar $360,969 \pm 10,542 \mu\text{g/mL}$, fraksi heksana memiliki IC_{50} sebesar $1700,669 \pm 72,295 \mu\text{g/mL}$, fraksi diklometana memiliki IC_{50} sebesar $931,392 \pm 66,736 \mu\text{g/mL}$, fraksi etil asetat memiliki IC_{50} sebesar $1082,715 \pm 67,798 \mu\text{g/mL}$, dan residu memiliki IC_{50} sebesar $1205,687 \pm 130,771 \mu\text{g/mL}$. Ekstrak metanol memiliki nilai IC_{50} yang paling rendah tetapi berdasarkan literatur nilai IC_{50} yang baik adalah $< 100 \mu\text{g/mL}$ pada pengujian senyawa anti-infektif sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak metanol dan fraksi daun anyang-anyang tidak poten dalam menghambat pertumbuhan *E. coli*.



PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Subhanallahu Wa Ta'ala atas segala ridho dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Skринing Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Anyang-Anyang (*Elaeocarpus grandiflorus* J. E. Smith) terhadap *Escherichia coli*”. 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 dan dukungan dari berbagai pihak, maka dari itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Mama Sunu Dwi Astuti Rini, Papa Hermansyah, Kakak Erytha Citra Rini Ochyviansyah dan Dwi Intan Yuliansyah, Achmad Syarifudin Noor serta seluruh keluarga yang telah memberi 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, S.F., GdipSc., Msc-Res., Ph.D., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama dan Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan memberi fasilitas bagi penulis dalam menyusun skripsi.
4. Bapak Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji II atas segala kritik dan saran yang diberikan selama penyusunan skripsi.
5. Ibu Diana Holiday, S.F., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa memberikan bimbingan akademik selama penulis kuliah di Fakultas Farmasi Univeritas Jember.
6. Ibu Wayan, Mbak Hani, Mbak Dini, Mbak Indri, Bu Itus, Mbak Parkha, Ibu Widi, Mas Erwan, Mbak Azizah, Ibu Ning yang telah membantu penulis saat melakukan penelitian di laboratorium.

7. Intan Kamila Adiba dan Ananda Mugita Dewi sebagai sahabat yang senantiasa mendengarkan curahan hati dan memberi dukungan kepada penulis.
8. Sevilla, Dyah, dan Maya sebagai sahabatku di Permanen yang senantiasa mendukung dan berbagi cerita sejak Sekolah Menengah Pertama.
9. Sepupuku Savira dan Annisa yang selalu menghibur penulis.
10. Mbak Hanum, Mbak Alfia, Mbak Tari sebagai kakak yang senantiasa membantu dan mendukung penulis.
11. Rekan kerja *Worm Project* dan Antibakteri MMB (Ita, Nimas, Ifan, dan Ridho) yang telah berjuang bersama dalam menyelesaikan skripsi.
12. Segenap anggota grup riset *Drug Utilisation and Discovery Research Group* (DUDRG).
13. Sahabat-sahabat seperjuangan di Lab Tuman (Lanjar, Nita, Asrin, Tinton, Jumahwi, Fawas, dan Retno) yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi.
14. Segenap keluarga kelas C Fakultas Farmasi Universitas Jember angkatan 2015.
15. Seluruh teman-teman Fakultas Farmasi Universitas Jember angkatan 2015 “Libitum”.
16. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan penulis satu per satu.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis mendapatkan balasan dari Allah Subhanallahu Wa Ta’ala.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi banyak orang.

Jember, 28 Juni 2019

Penulis

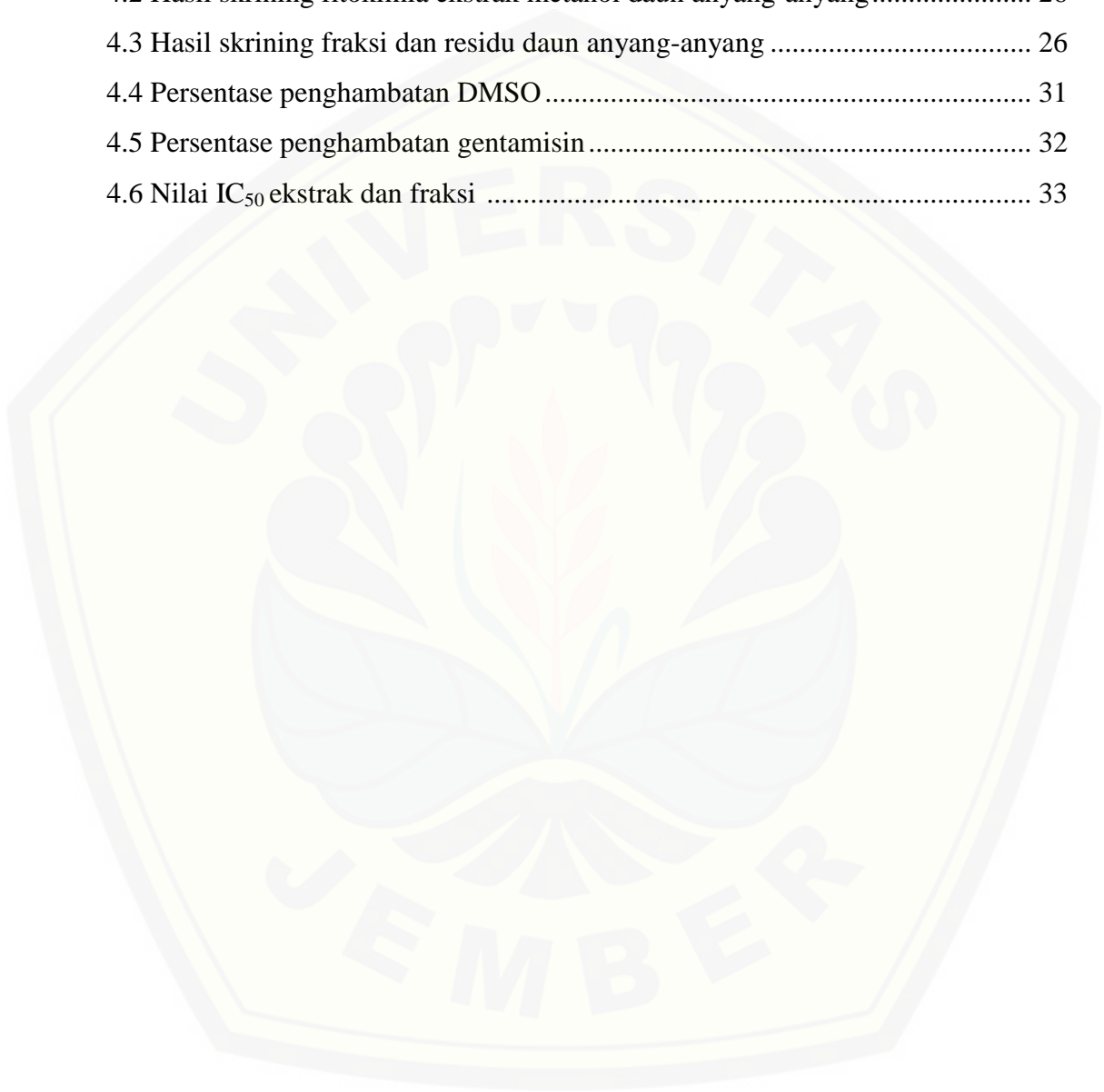
DAFTAR ISI

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	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR RUMUS	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 <i>Escherichia coli (E. coli)</i>	5
2.2 Antibakteri.....	6
2.3 <i>Elaeocarpus grandiflorus</i> J. E. Smith.	7
2.3.1 Taksonomi.....	7
2.3.2 Morfologi	7
2.3.3 Habitat.....	8
2.3.4 Khasiat	8
2.3.5 Kandungan Kimia	9
2.4 Ekstraksi dan Fraksinasi.....	10
2.4.1 Ekstraksi.....	10

2.4.2	Fraksinasi	11
2.5	Skrining Fitokimia	11
2.6	Uji Aktivitas Antibakteri.....	12
BAB 3.	METODOLOGI PENELITIAN	14
3.1	Jenis Penelitian.....	14
3.2	Rancangan Penelitian	14
3.3	Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
3.4	Alat dan Bahan.....	14
3.5	Variabel Penelitian.....	15
3.6	Definisi Operasional.....	16
3.7	Prosedur Penelitian.....	16
3.8	Analisis Data.....	21
3.9	Alur Penelitian	23
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1	Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Anyang-anyang	24
4.2	Skrining Fitokimia	26
4.3	Uji Aktivitas Antibakteri.....	30
BAB 5.	KESIMPULAN	35
5.1	Kesimpulan.....	35
5.2	Saran	35
DAFTAR PUSTAKA		36
LAMPIRAN.....		41

DAFTAR TABEL

4.1 Rendemen hasil fraksinasi daun anyang-anyang	25
4.2 Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol daun anyang-anyang.....	26
4.3 Hasil skrining fraksi dan residu daun anyang-anyang	26
4.4 Persentase penghambatan DMSO	31
4.5 Persentase penghambatan gentamisin	32
4.6 Nilai IC ₅₀ ekstrak dan fraksi	33



DAFTAR GAMBAR

2.1 Morfologi <i>E. coli</i>	6
2.2 Tumbuhan Anyang-anyang.....	8
2.3 Struktur Geraniin.....	10
3.1 Pemetaan Mikrodilusi pada <i>microplate-96-well</i>	19
3.2 Skema Fraksinasi Bertingkat Daun Anyang-anyang	20
3.3 Skema Penelitian.....	23
4.1 Proses Ekstraksi dan Fraksinasi	25
4.2 Skrining Golongan Senyawa Alkaloid.....	27
4.3 Skrining Golongan Senyawa Flavonoid	28
4.4 Skrining Golongan Senyawa Polifenol	29
4.5 Skrining Golongan Senyawa Terpenoid	30

DAFTAR RUMUS

3.1 Persen (%) Penghambatan 22



DAFTAR LAMPIRAN

4.1	Perhitungan rendemen ekstrak dan fraksi	41
4.2	Perhitungan pembuatan media CAMHB	44
4.3	Perhitungan konsentrasi kontrol positif/gentamisin.....	46
4.4	Perhitungan konsentrasi ekstrak dan fraksi daun anyang-anyang.....	47
4.5	Data hasil dan persentase penghambatan DMSO	48
4.6	Data hasil dan persentase penghambatan gentamisin	49
4.7	Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol.....	52
4.8	Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi heksana	55
4.9	Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi diklorometana	58
4.10	Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat.....	61
4.11	Hasil uji aktivitas antibakteri residu.....	64
4.12	IC ₅₀ ekstrak metanol.....	67
4.13	IC ₅₀ fraksi heksana	70
4.14	IC ₅₀ fraksi diklorometana	73
4.15	IC ₅₀ fraksi etil asetat.....	76
4.16	IC ₅₀ residu.....	79

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi bakteri menjadi salah satu dari penyebab kematian paling utama sepanjang sejarah manusia. Berjuta orang meninggal akibat infeksi bakteri dan hal tersebut terjadi dari ribuan tahun yang lalu hingga saat ini (Walsh, 2002). Menurut *World Health Organization* (WHO) (2018), terdapat 9 juta orang meninggal akibat penyakit infeksi setiap tahunnya. Pengobatan yang paling tepat untuk mengatasi infeksi bakteri adalah antibiotik. Antibiotik dapat menghentikan pertumbuhan atau mematikan bakteri penyebab infeksi. Saat ini antibiotik telah menjadi obat yang paling sering digunakan dan tidak hanya pada manusia tetapi juga pada dunia peternakan dan pertanian (Lancini dkk., 1995).

Saat ini jumlah kasus resistensi bakteri terhadap antibiotik cukup tinggi. Penyebab resistensi antibiotik yakni akibat penggunaan antibiotik secara tidak bijak. Menurut Kemenkes RI (2011) dalam Kurniawati dkk., (2015), terdapat sekitar 40–62% antibiotik digunakan untuk penyakit-penyakit yang tidak semestinya membutuhkan antibiotik. Hal tersebut menyebabkan berbagai macam *Multidrug Resistance Organisms* (MDROs) dimana bakteri tidak sensitif lagi terhadap beberapa golongan antibiotik untuk mengobati infeksi. *Multidrug Resistance Organisms* (MDROs) merupakan bakteri yang resisten terhadap tiga atau lebih golongan atau kelas antimikroba yang berbeda (D'Agata, 2004).

Bakteri gram-negatif merupakan bakteri yang banyak mengalami resistensi terhadap berbagai antibiotik (Exner dkk., 2017), hal tersebut disebabkan oleh rendahnya permeabilitas dari dinding sel bakteri gram-negatif sehingga menyebabkan antibiotik susah untuk terpenetrasi (Bérdy, 2005). Salah satu bakteri yang tergolong bakteri gram-negatif adalah bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*). Menurut *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (2019), bakteri *E. coli* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan diare, infeksi saluran kemih, infeksi pernapasan, dan pneumonia.

Saat ini sudah banyak penelitian terkait aktivitas antibakteri suatu tumbuhan dalam melawan bakteri *E. coli*. Pengobatan secara tradisional dari tumbuhan liar selalu menarik perhatian para peneliti dalam menemukan molekul obat baru (Gul dkk., 2017). Pemanfaatan bahan alam sebagai obat cenderung meningkat dengan beredarnya pola pikir *back to nature* (Swari, 2015) dan secara umum dinilai lebih aman karena memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit daripada obat modern (Ardani dkk., 2010). Selama ini industri obat tradisional menggunakan bahan baku sebagian besar berasal dari tumbuhan yang hidup di alam liar atau dibudidayakan dalam skala kecil di lingkungan sekitar rumah (Swari, 2015). Penelitian saat ini sudah banyak dilakukan terhadap khasiat antibakteri pada suatu tanaman. Salah satu alternatif untuk menemukan antibakteri baru dari bahan alam yakni dengan memanfaatkan tumbuhan anyang-anyang.

Anyang-anyang merupakan pohon hijau dengan tinggi mencapai 25 meter yang tersebar di Jawa, Malaysia, Myanmar, Filipina, Laos, Vietnam. Anyang-anyang banyak tumbuh di daerah beriklim tropis dan subtropis. Anyang-anyang tumbuh baik di ketinggian 1000-1200 mdpl, di area dengan intensitas matahari penuh. Secara tradisional ekstrak kulit dan daunnya digunakan sebagai tonik untuk meningkatkan nafsu makan. Infusa kulitnya digunakan untuk demam, bisul, penyakit wanita. Daun muda dioleskan pada dahi untuk mengobati sakit kepala (Rahayu dkk., 2017), ekstrak daunnya juga memiliki aktivitas antidiabetes (Bualee dkk., 2007), bijinya digunakan sebagai komposisi umum dalam banyak jamu tradisional dengan sifat diuretik ringan (Rahayu dkk., 2017). Rahman (1997) telah berhasil mengisolasi tannin, geraniin, dan 3,4,5-trimetoksi geraniin dari daun anyang-anyang. Berdasarkan penelitian Rahman (1997), daunnya memiliki aktivitas antimikroba melawan *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*. Berdasarkan pemaparan di atas diduga bahwa daun anyang-anyang mengandung senyawa yang mempunyai aktivitas antimikroba.

Berdasarkan hal tersebut akan dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah terdapat aktivitas antibakteri daun anyang-anyang terhadap *E. coli*. Pemanfaatan ekstrak metanol daun anyang-anyang dapat berpotensi dalam mendukung penelitian pengembangan tanaman obat sebagai agen antibakteri

terhadap *E. coli*. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol anyang-anyang pada penelitian ini menggunakan metode dilusi. Hasil uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini berupa nilai konsentrasi yang mampu membunuh 50% sampel uji atau *half maximal inhibitory concentration* (IC₅₀) (Kolarević dkk., 2016).

Suatu tanaman yang memiliki aktivitas antibakteri biasanya disebabkan karena adanya kontribusi dari kandungan metabolit-metabolit sekunder. Belum terdapat penelitian mengenai skrining fitokimia pada daun anyang-anyang terkait identifikasi metabolit sekunder yang kemungkinan terkandung di dalamnya. Berdasarkan uraian tersebut maka pada penelitian ini akan dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada daun anyang-anyang.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan ulasan diatas, rumusan masalah pada penelitian ini antara lain:

1. Apa saja golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak metanol, fraksi heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat, dan residu daun anyang-anyang?
2. Berapa nilai IC₅₀ ekstrak metanol, fraksi heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat, dan residu daun anyang-anyang terhadap *E. coli*?

1.3 Tujuan Penelitian

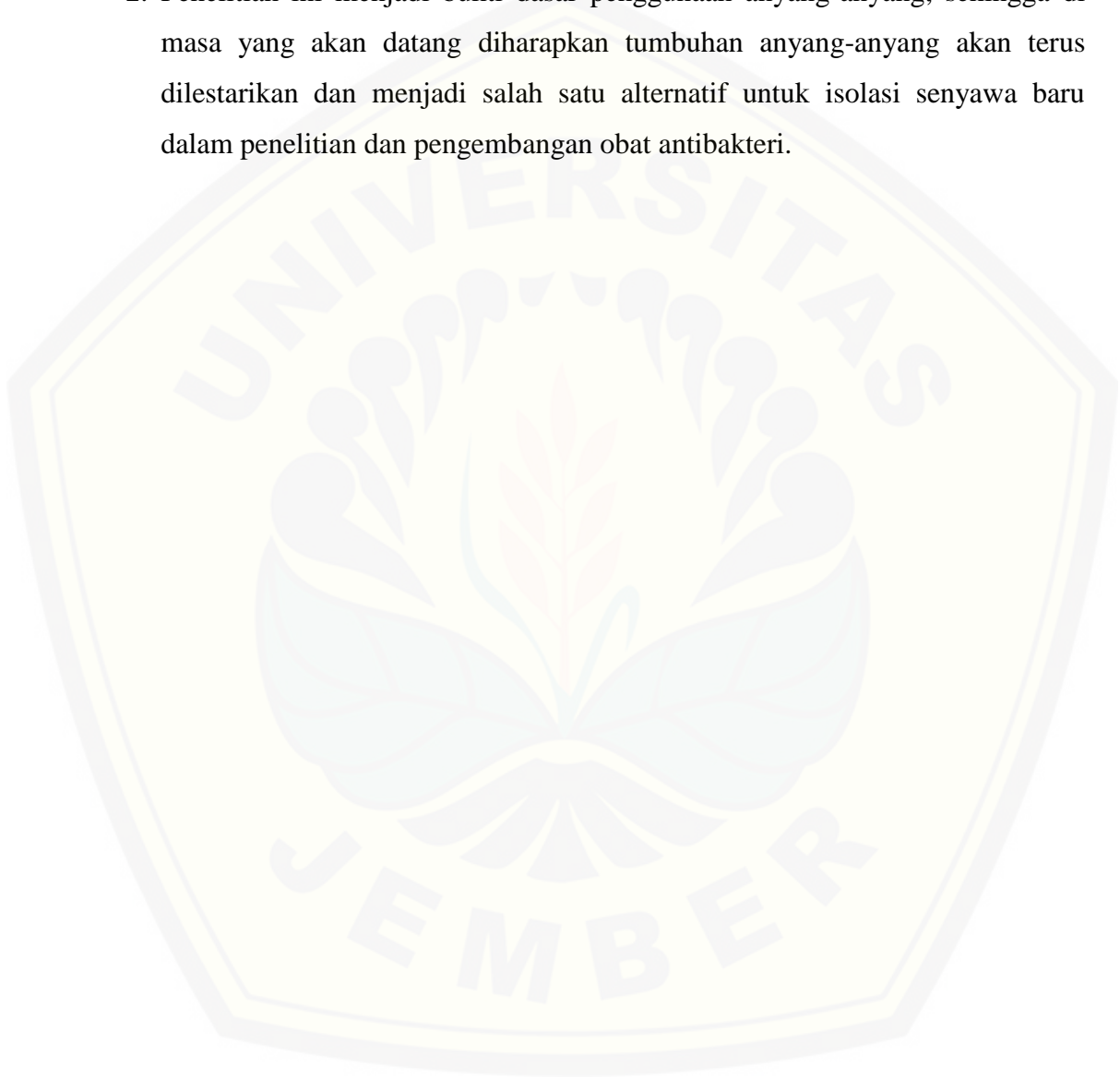
Tujuan pada penelitian ini antara lain:

1. Untuk mengetahui kandungan fitokimia dari ekstrak metanol, fraksi heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat tumbuhan anyang-anyang.
2. Untuk mengetahui nilai IC₅₀ ekstrak metanol, fraksi heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat, residu daun anyang-anyang terhadap *E. coli*.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini antara lain:

1. Memberikan informasi mengenai sumber antibakteri baru berbasis tanaman obat anyang-anyang.
2. Penelitian ini menjadi bukti dasar penggunaan anyang-anyang, sehingga di masa yang akan datang diharapkan tumbuhan anyang-anyang akan terus dilestarikan dan menjadi salah satu alternatif untuk isolasi senyawa baru dalam penelitian dan pengembangan obat antibakteri.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli merupakan bakteri gram-negatif berbentuk batang, tidak membentuk spora, bersifat aerobik atau aerobik fakultatif yang umumnya terdapat secara normal dalam saluran pencernaan. Bakteri ini dapat tumbuh dengan baik pada suhu 8⁰C-46⁰C dan dengan suhu pertumbuhan optimal adalah 37⁰C. *E. coli* dapat bersifat patogen apabila jumlahnya melebihi normal (Elfidasari dkk., 2011).

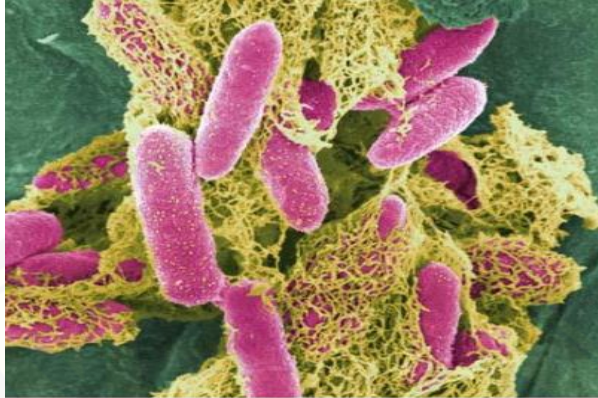
Berikut adalah taksonomi dari *E. coli* (itis.gov, 2018):

Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherichia
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

E. coli dapat menyebabkan pada penyakit manusia maupun hewan. Beberapa strain *E. coli* dapat menyebabkan penyakit enterik mulai dengan gejala menyerupai diare, kolera hingga disentri parah sedangkan strain yang lain dapat menyebabkan penyakit saluran kemih, sistitis atau pielonefritis, atau dapat menyebabkan infeksi ekstraintestinal lainnya, seperti septikemia dan meningitis (Donnenberg dan Whittam, 2001).

Bakteri *E. coli* dapat mengontaminasi lingkungan dimana kontaminasi ini dapat terjadi melalui kotoran manusia, kotoran ternak ternak atau limbah hewan lainnya, limbah cair dari rumah pemotongan hewan serta limbah cair dari pabrik pengolahan air limbah. Bakteri *E. coli* yang berada di lingkungan dapat membentuk biofilm terutama pada permukaan lingkungan akuatik yang menyebabkan bakteri tersebut menjadi persisten. Biofilm ini dapat melindungi bakteri dari kondisi lingkungan yang buruk seperti radiasi sinar UV, protozoa pemangsa, dan bahan kimia termasuk antibiotik dan desinfektan. Sel sel bakteri

yag terlepas dari biofilm dewasa dapat membentuk biofilm baru meskipun tidak ada kontaminasi tinja dalam lingkungan (Jang dkk., 2017).



Gambar 2.1 Morfologi *E. coli* (Collier dkk., 2010)

E. coli yang termasuk ke dalam bakteri gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang terletak di antara membran sitoplasma dan membran luar. Senyawa yang menghambat target intraseluler harus mampu melewati membran ini. Membran luar terdiri dari lapisan ganda asimetris yang terdiri dari lipopolisakarida (LPS) dan bagian dalam fosfolipid. Membran luar hanya permeabel terhadap senyawa berukuran kecil dan hidrofobik sementara membran sitoplasma hanya permeabel terhadap senyawa hidrofilik. Senyawa asing yang mampu melewati membran luar dapat dikeluarkan kembali oleh pompa efluks. Struktur seluler pelindung ini menghambat agen antibakteri sulit untuk dapat masuk ke dalam sel bakteri (Singh dkk., 2017).

2.2 Antibakteri

Antibakteri adalah agen antimikroba yang digunakan untuk menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri (CDC, 2018). Antibakteri sering disebut dengan istilah antibiotik. Banyak antibiotik memiliki spektrum aktivitas yang luas, efektif dalam pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram-positif dan juga bakteri gram-negatif, sementara yang lain efektif untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram-positif saja. Antibiotik yang ideal adalah agen antibakteri yang membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri

berbahaya dalam inang tanpa mempengaruhi flora normal atau menyebabkan toksisitas yang tidak semestinya pada inang dengan potensi resistensi yang rendah (Singh dkk., 2017).

Sebagian besar antibiotik dalam penggunaan klinis saat ini tidak memiliki spektrum yang cukup luas untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh semua infeksi bakteri gram-positif dan gram-negatif. Oleh karena itu, sebagian besar antibiotik saat ini dikelompokkan sebagai agen gram-positif, agen gram-negatif, dan beberapa lainnya dengan cakupan sebagian dari beberapa gram-positif serta beberapa infeksi bakteri gram-negatif (Singh dkk., 2017).

2.3 *Elaeocarpus grandiflorus* J. E. Smith.

2.3.1 Taksonomi

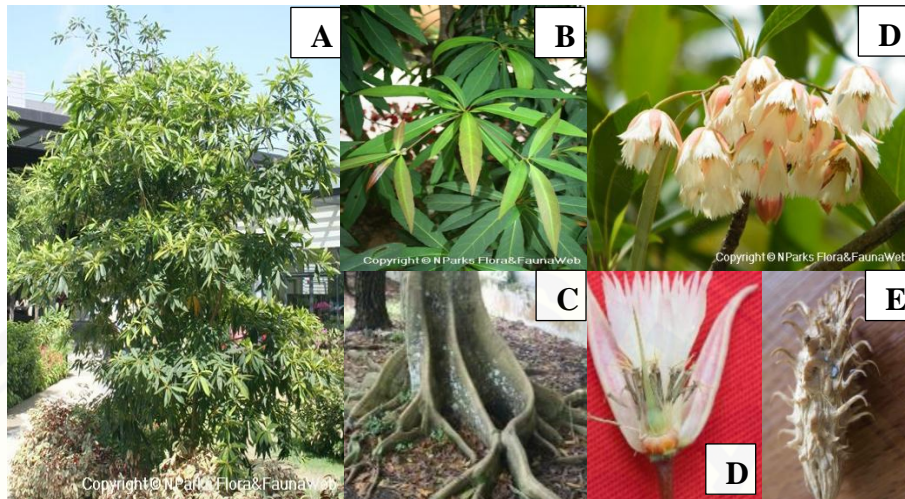
Berdasarkan Catalogue of Life (2018), taksonomi tumbuhan *Elaeocarpus grandiflorus* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Filum	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Oxalidales
Famili	: Elaeocarpaceae
Genus	: Elaeocarpus
Spesies	: <i>Elaeocarpus grandiflorus</i> J. E. Smith.

2.3.2 Morfologi

Elaeocarpus grandiflorus atau biasa dikenal dengan anyang-anyang, rejasa (Jawa), Lilly of the Valley tree dijumpai sebagai pohon hijau dengan tinggi mencapai 25 meter. Batangnya tegak dengan terdapat beberapa akar sebagai penopang. Daun muda berwarna kemerahan bila daun sudah tua maka berubah menjadi merah sebelum gugur. Daunnya sederhana berbentuk lanset dan bergerigi. Dari ujung masing-masing cabang tumbuh banyak bunga. Bunganya menjuntai, bergerombol, sepal berwarna merah muda kemerahan dengan kelopak berwarna putih dengan tepi berjumbai. Buahnya berwarna hijau berbentuk

ellipsoid mengandung biji dengan duri tipis memanjang berbalik arah (National Parks Board Singapore, 2013; Rahayu dkk., 2017).



Gambar 2.2 Anyang-anyang A)Tumbuhan, B)Daun, C)Akar, D)Bunga, E)Biji (National Parks Board Singapore, 2013; Rahayu dkk., 2017).

2.3.3 Habitat

Anyang-anyang terdistribusi di daerah Jawa, peninsular Malaysia (Kedah, Pahang, Selangor), Myanmar (Burma), Filipina (Busuanga), Laos, Vietnam. Habitat aslinya ialah di hutan hujan. Tumbuhan ini banyak tumbuh di iklim tropis dan subtropis. Tumbuhan ini mampu bertahan hidup dengan baik di tanah kering dan nutrisi rendah (National Parks Board Singapore, 2013).

2.3.4 Khasiat

Ekstrak air daun, buah dan ranting anyang-anyang telah secara tradisional digunakan untuk mengobati diabetes (Bualee dkk., 2007), daunnya secara tradisional digunakan sebagai obat penyakit kulit (Goun dkk., 2003), anti-diuretik (Shah dkk., 2011). Simplisia anyang-anyang digunakan untuk mengobati penyakit ginjal, penyakit kulit, penyakit kuning, penyakit saluran pembuangan, penyakit pencernaan, sakit kepala dan demam (Swari, 2015).

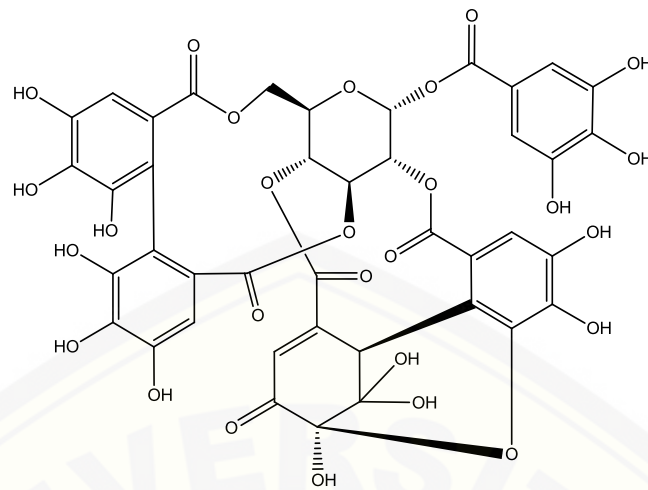
Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak kloroform-metanol (1:1 v/v) daun anyang-anyang dengan konsentrasi 1000 µg/mL dan fraksi tak larut heksana memiliki aktivitas antimikroba pada *Staphylococcus aureus* dan *Candida*

albicans (Rahman, 1997). Ekstrak air daun, buah, dan ranting anyang-anyang menunjukkan efek hipoglikemik pada tikus yang diinduksi aloksan (Bualee et al., 2007). Ekstrak diklorometana memiliki aktivitas anti jamur dalam melawan *Scleretonium rolfsii* dan *Aspergillus fumigatus*, ekstrak metanol memiliki aktivitas melawan jamur *Phytium ultimum*, ekstrak bunga dalam metanol maupun air memiliki aktivitas sebagai anti-HIV-1 protease dengan IC₅₀ sebesar 100 µg/ml (Keller dan Nugraha, 2011).

Buahnya memiliki aktivitas menghambat virus HIV protease (Salehi dkk., 2018), ekstrak metanol sebesar 100 mg/mL aktif melawan jamur *Phytium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Scleretonium rolfsii* dan ekstrak metilen klorida 100 mg/ml aktif melawan *Scleretonium rolfsii* (Goun dkk., 2003). Ekstrak metanol buahnya memiliki IC₅₀ sebesar 500 µg/ml dan ekstrak air sebesar 420 µg/ml dalam menghambat enzim reverse transkriptase RNA pada virus tumor (Kusumoto dkk., 1992). Kandungan disakarida dari tumbuhan anyang-anyang ini bisa menjadi inhibitor aktif terhadap protein tirosin phosphatase 1B (PTB1B) (Saifudin dkk., 2016).

2.3.5 Kandungan Kimia

Rahman (1997) telah berhasil mengisolasi tannin, geraniin dan 3,4,5-trimetoksi geraniin dari daun anyang-anyang. Saifudin dkk., (2016) melakukan pengamatan sampel *E. grandiflorus* pada ¹³C NMR yang menunjukkan adanya sinyal golongan gula. Spektrum ¹H dan ¹³C NMRnya menunjukkan sebelas sinyal karbon yang mirip dengan sukrosa.



Gambar 2.3 Struktur Geraniin

2.4 Ekstraksi dan Fraksinasi

2.4.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan pemisahan senyawa dari kompleks matriks biologis yang berasal dari tumbuhan atau hewan menggunakan pelarut yang cocok dan dapat melibatkan atau tidak melibatkan energi panas (Mandal dkk., 2015) kemudian pelarut dihilangkan dengan cara diuapkan. Terdapat beberapa metode ekstraksi antara lain maserasi, perkolasi, digesti, sokletasi, dekok, infusa, dan lain-lain (Azmir dkk., 2013).

Metode ekstraksi yang cenderung digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Maserasi merupakan proses penyarian simplisia yang direndam dalam pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan (Ditjen POM, 2000). Pengadukan dilakukan untuk meningkatkan difusi dan menghilangkan larutan pekat dari permukaan sampel agar pelarut baru masuk ke dalam sampel untuk hasil ekstraksi yang lebih banyak (Azmir dkk., 2013). Pelarut akan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif yang akan larut. Adanya perbedaan konsentrasi larutan zat aktif didalam sel dan diluar sel maka larutan yang pekat didorong keluar. Proses tersebut terjadi hingga terdapat konsentrasi senyawa yang seimbang didalam pelarut dan didalam sel tanaman (Ditjen POM, 2000). Metode maserasi dipilih karena sederhana, biayanya terjangkau, serta dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang termolabil.

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dapat berupa air, etanol, metanol, etanol-air atau pelarut lainnya. Pada penelitian ini dipilih pelarut metanol karena metanol merupakan pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa organik baik polar maupun non polar (Sayuti, 2017).

2.4.2 Fraksinasi

Ekstrak awal yang diperoleh biasanya masih dalam bentuk campuran senyawa. Hal tersebut sulit untuk mendapatkan senyawa individu dari campuran senyawa tersebut. Oleh karena itu, ekstrak kasar awalnya dipisahkan menjadi berbagai fraksi diskrit melalui fraksinasi (Van Middlesworth dan Cannell, 1998).

Fraksinasi merupakan penarikan senyawa dari suatu ekstrak berdasarkan sifat fisiko-kimianya. Metode fraksinasi yang dipilih dipengaruhi oleh jenis kelarutan hingga kepolaran suatu senyawa (Houghton dan Raman, 1998). Secara umum metode fraksinasi yang digunakan antara lain partisi cair-cair, pengendapan, destilasi, dan kromatografi. Metode fraksinasi partisi cair-cair dilakukan dengan menggunakan dua pelarut yang tidak saling campur sehingga terbentuk dua fasa. Metode ini mengaplikasikan prinsip *like dissolved like*, yakni kelarutan senyawa antar dua fasa akan tergantung pada kemiripan antara polaritas senyawa dengan cairan pelarut (Irwan, 2017).

2.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia atau penapisan fitokimia merupakan tahap awal pada penelitian fitokimia yang terdapat dalam tumbuhan. Melalui skrining fitokimia maka dapat diketahui suatu gambaran tentang golongan senyawa apa saja yang terkandung dalam suatu tanaman. Skrining fitokimia biasanya dilakukan untuk menentukan kandungan golongan senyawa alkaloid, glikosida, steroid, flavonoid, polifenol, tanin, saponin dsb. (Kristianti dkk., 2008).

Tujuan skrining fitokimia dalam menentukan kandungan golongan senyawa pada tumbuhan menjadi perlu untuk dipertimbangkan sebab dengan mengetahui kandungan kimia suatu tumbuhan maka kita dapat mengetahui

kandungan kimia yang mana yang berperan dalam memberikan efek farmakologis (Simaremare, 2014).

Skrining fitokimia dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu metode tabung dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada penelitian kali ini metode yang digunakan adalah KLT sebab metode tersebut lebih peka dan jumlah sampel yang dibutuhkan tidak sebanyak metode tabung. Hasil perubahan warna yang dihasilkan dari reaksi reagen dan senyawa yang dipisahkan menjadi lebih spesifik akibat dari tidak adanya gangguan oleh perubahan warna dari golongan senyawa lainnya yang berada dalam satu sampel yang mungkin terjadi dengan reagen yang sama.

2.6 Uji Aktivitas Antibakteri

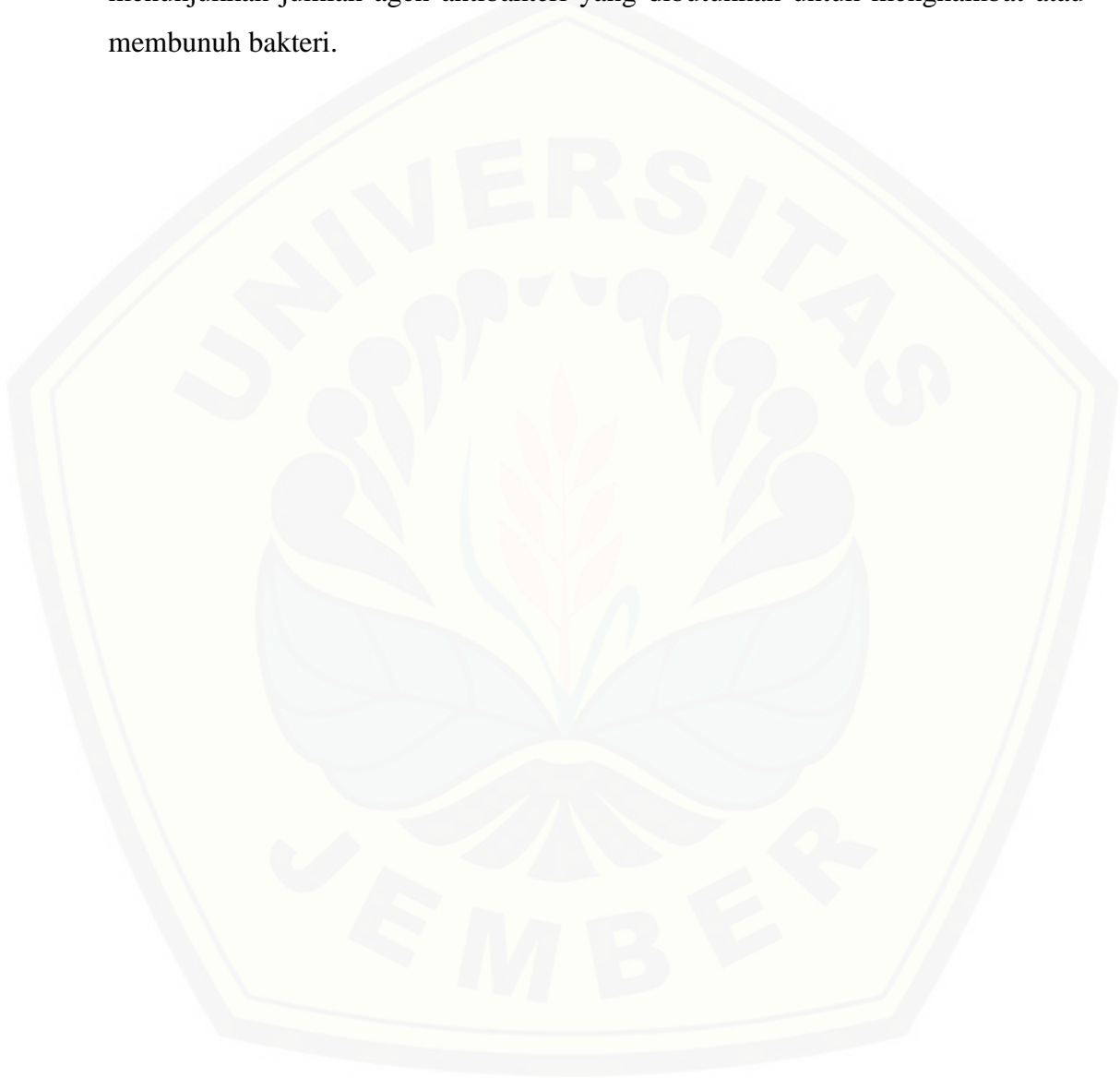
Metode untuk pengujian aktivitas antibakteri dalam penemuan agen antibakteri baru telah banyak digunakan dan terus dikembangkan. Beberapa teknik pengujian yang sering digunakan dan sudah terstandarisasi oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) antara lain metode difusi dan dilusi (Balouiri dkk., 2016).

Metode dilusi adalah metode yang tepat untuk menentukan nilai konsentrasi hambat minimum (*Minimum Concentration Inhibitor/MIC*) karena metode tersebut dapat memperkirakan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam media agar (dilusi agar) atau media *broth* (makrodilusi atau mikrodilusi). Baik metode dilusi agar maupun dilusi *broth* digunakan secara kuantitatif untuk mengukur aktivitas antimikroba. Nilai MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari zat antimikroba yang diuji yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji dan biasanya dinyatakan dalam $\mu\text{g/mL}$ atau mg/L (Balouiri dkk., 2016).

Salah satu metode dilusi yang telah terstandarisasi oleh CLSI adalah metode mikrodilusi. Metode ini disebut mikrodilusi karena melibatkan penggunaan volume kecil *broth* pada sumuran mikrodilusi. Mikrodilusi

melibatkan pembuatan dua kali lipat pengenceran agen antimikroba (misalnya 1, 2, 4, 8, 16 dan 32 ug/mL) dalam medium pertumbuhan cair (CLSI, 2018).

Pada penelitian ini dipilih metode mikrodilusi karena lebih ekonomis terkait jumlah bahan yang digunakan dan dapat memberi hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah agen antibakteri yang dibutuhkan untuk menghambat atau membunuh bakteri.



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Anyang-Anyang (*Elaeocarpus grandiflorus*) terhadap *E. coli* ini adalah penelitian *true experiment*.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan termasuk *the post test control only group design*. Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri adalah metode mikrodilusi. Penelitian dibagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan akan diukur absorbansinya untuk penetapan nilai IC_{50} .

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi, Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi, Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember mulai bulan Februari hingga Mei 2019.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas alat-alat gelas, ayakan mesh 100, blender, *yellow tip*, *blue tip*, spatula logam, cawan porselen, jarum ose, *bunsen burner*, *incubator*, *microplate flat bottom 96 wells* (Iwaki), mikropipet (Socorex dan Eppendorf), *12-channel micropipet* (Socorex), *Laminar Air Flow*, autoklaf (All American), *microplate reader* (Corona SH-1000), *hot plate* (UC152), timbangan analitik, *vortex* (Hiedolph), corong pisah (Pyrex),

cawan petri *disposable*, oven, corong buchner, pompa vakum, kertas saring whatmann.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk membuat simplisia antara lain adalah daun simplisia kering *E. grandiflorus* yang diperoleh dari Materia Medika, Batu, Malang. Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi dan fraksinasi adalah metanol pa, heksana, diklorometana, etil asetat. Bahan yang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri antara lain adalah DMSO, akuades demineralisasi (Hydrobatt), parafilm (M parafilm), CaCl_2 dan MgCl_2 . Bakteri uji yang digunakan adalah *E. coli*. Media bakteri yang digunakan antara lain adalah *Mueller Hinton Broth* (MHB) dan *Mueller Hinton Agar* (MHA). Larutan pembanding adalah injeksi gentamisin 40 mg/mL.

3.5 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi uji sampel. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol, fraksi heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi diklorometana, serta residu dengan seri konsentrasi 2048 $\mu\text{g/mL}$, 1024 $\mu\text{g/mL}$, 512 $\mu\text{g/mL}$, 256 $\mu\text{g/mL}$, 128 $\mu\text{g/mL}$.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai IC_{50} sampel uji terhadap *E. coli* dalam media *Cation Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB) setelah inkubasi 20 jam pada suhu 37°C .

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah metode ekstraksi maserasi, metode fraksinasi partisi cair-cair, media MHA dan CAMHB, jenis bakteri, suhu inkubasi, λ pengamatan serta cara pengukuran hasil uji.

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini antara lain:

- a. Tumbuhan anyang-anyang yang digunakan adalah bagian daun yang diperoleh dari *Materia Medica*, Batu, Malang.
- b. Metode guna memperoleh ekstrak metanol tumbuhan adalah ekstraksi maserasi. Metode guna memperoleh fraksi heksana, diklorometana, etil asetat, dan residu tumbuhan adalah partisi cair-cair.
- c. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri gram negatif *E. coli*.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Pembuatan Serbuk

Tumbuhan yang diperoleh dari *Materia Medica* sudah dalam bentuk simplisia kering. Simplisia yang diperoleh selanjutnya dikecilkan ukurannya menggunakan *blender*. Serbuk yang diperoleh kemudian diayak dengan ayakan mesh 100 agar diperoleh ukuran yang homogen.

3.7.2 Pembuatan Ekstrak Metanol Tumbuhan *E. grandiflorus*

Serbuk dimasukkan ke dalam erlenmeyer tertutup lalu ditambahkan pelarut metanol pro analisis dengan perbandingan 1:20 (b/v). Ekstraksi dilakukan diatas *stirer*. Ekstrak disaring dan dikumpulkan filtratnya lalu dilakukan remaserasi. Filtrat yang terkumpul dipekatkan. Ekstrak pekat dikeringkan dalam oven suhu 40°C untuk memperoleh ekstrak kental atau kering. Ekstrak yang diperoleh dihitung rendemennya.

3.7.3 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode mikrodilusi yang disesuaikan dengan protokol yang telah distandardisasi oleh *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) M07-A9*.

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat gelas, *yellow tip*, *blue tip*, dan media yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121^oC selama 15 menit. Jarum ose dapat disterilisasi dengan pemijaran.

b. Pembuatan Media

1. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Pembuatan media MHA digunakan untuk peremajaan bakteri uji. Sebanyak 1,6 gram media dilarutkan dalam 80 mL akuades demineralisasi hingga mendidih menggunakan *hot plate*. Kemudian media disterilisasi dengan autoklaf suhu 121^oC selama 15 menit. Media yang telah disterilisasi lalu dituang ke dalam 4 cawan petri steril dengan masing-masing volume 20 mL dan ditunggu hingga memadat.

2. Pembuatan Media *Mueller Hinton Broth* (MHB)

Pembuatan media cair *cation-adjusted* MHB (CAMHB) digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi. Media CAMHB dibuat dari media MHB dengan penambahan MgCl₂ dan CaCl₂. Media MHB dibuat dengan melarutkan 1,78 gram MHB dalam 80 mL akuades demineralisasi. Media disterilisasi dengan autoklaf suhu 121^oC selama 15 menit.

Media MHB yang telah disterilisasi ditambahkan dengan MgCl₂ dan CaCl₂ hingga konsentrasi Mg²⁺ menjadi 10-12,5 mg Mg²⁺/L dan konsentrasi Ca²⁺ adalah 20-25 mg Ca²⁺/L. Pembuatan larutan induk MgCl₂ dibuat dengan melarutkan 836,46 mg MgCl₂.6H₂O dalam 10 mL akuades demineralisasi sehingga didapat konsentrasi 10 mg Mg²⁺/mL. Pembuatan larutan induk CaCl₂ dibuat dengan melarutkan 366,81 mg CaCl₂.2H₂O dalam 10 mL akuades demineralisasi hingga kadar Ca²⁺/mL sebesar 10 mg. Pada 80 mL media MHB yang telah disterilisasi, ditambahkan larutan induk MgCl₂ sebesar 0,08 – 0,1 mL dan larutan induk CaCl₂ sebesar 0,16-0,2 mL hingga diperoleh konsentrasi 10-12,5 mg Mg²⁺/L dan 20-25 mg Ca²⁺/L.

c. Peremajaan Biakan Murni

Peremajaan biakan murni pada media MHA dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Jarum ose yang sudah mengandung *E. coli* digoreskan ke media padat. Lalu cawan petri disegel menggunakan parafilm dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri uji *E. coli* yang telah diremajakan diambil 2-3 koloni lalu dibuat suspensi homogen dalam media CAMHB. Suspensi tersebut disesuaikan kekeruhannya dengan standar Mc Farland 0,5 menggunakan spektrofotometer pada λ_{625} nm. Absorbansi yang dituju sebesar 0,08-0,13.

e. Pembuatan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

1. Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan ialah injeksi gentamisin 40 mg/mL yang diencerkan dengan CAMHB menjadi 200 μ g/mL sebagai larutan induk. Lalu diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 4 μ g/mL, 2 μ g/mL, 1 μ g/mL, dan 0,5 μ g/mL.

2. Pembuatan Kontrol Negatif

Kontrol negatif menggunakan DMSO 1% dalam media CAMHB.

f. Pembuatan Larutan Uji

Seluruh sampel dilarutkan dalam DMSO 1% dalam media CAMHB. Sampel diencerkan menjadi 5 konsentrasi yaitu 2048 μ g/mL, 1024 μ g/mL, 512 μ g/mL, 256 μ g/mL, 128 μ g/mL.

g. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Mikrodilusi

Media CAMHB sebanyak 50 μ L, biakan aktif bakteri (dalam media CAMHB) sebanyak 50 μ L, kontrol negatif DMSO 1% sebanyak 50 μ L, kontrol positif gentamisin sebanyak 50 μ L, serta ekstrak atau fraksi tiap konsentrasi sebanyak 50 μ L dimasukkan ke dalam *microplate-96-well* sebanyak tiga replikasi sesuai dengan gambar. Kemudian *microplate* diinkubasi selama 20 jam pada suhu

37°C. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi pada λ_{625} nm menggunakan *microplate reader*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		2048 µg/mL	2048 µg/mL	2048 µg/mL	Yellow		Blue	Blue	Blue	Brown		
C		1024 µg/mL	1024 µg/mL	1024 µg/mL	Yellow		Blue	Blue	Blue	Brown		
D		512 µg/mL	512 µg/mL	512 µg/mL	Yellow		Blue	Blue	Blue	Brown		
E		256 µg/mL	256 µg/mL	256 µg/mL	Green		Blue	Blue	Blue	Light Blue		
F		128 µg/mL	128 µg/mL	128 µg/mL	Green		Blue	Blue	Blue	Light Blue		
G					Green		Blue	Blue	Blue	Light Blue		
H												

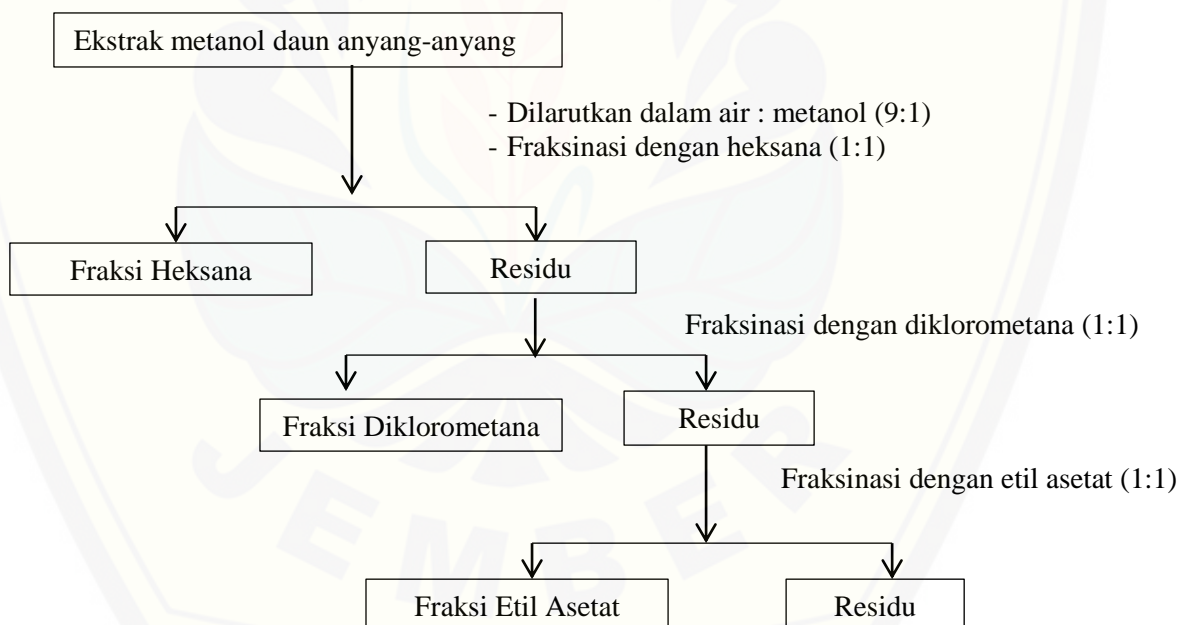
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Red	Red	Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange					
C		Red	Red	Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange					
D		Red	Red	Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange					
E		Red	Red	Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange					
F		Green	Green	Green	Light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

Gambar 3.1 Pemetaan mikrodilusi pada *microplate-96-well*

	= sampel ekstrak atau fraksi		= media CAMHB + bakteri dalam CAMHB
	= DMSO 1% + media CAMHB		= gentamisin + media CAMHB
	= media CAMHB		= gentamisin + bakteri dalam CAMHB
	= sampel + bakteri dalam CAMHB		= DMSO 1% + bakteri dalam CAMHB

3.7.4 Pembuatan Fraksi Daun Anyang-Anyang

Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi cair-cair secara bertingkat dengan bantuan penggojogan seperti pada gambar 3.2. Ekstrak kering dilarutkan dalam air dan sedikit metanol lalu dipartisi dengan heksana yang akan membentuk 2 fase. Fase atas diambil dan ditampung sebagai fraksi heksana. Fraksi yang diperoleh lalu disaring dan dipekatkan. Fraksinasi selanjutnya dilakukan dengan diklorometana. Fase bawah diambil dan ditampung sebagai fraksi diklorometana. Setelah diperoleh fraksi diklorometana maka disaring dan dipekatkan. Fraksinasi dilanjutkan menggunakan etil asetat. Fase atas diambil lalu ditampung sebagai fraksi etil asetat. Setelah diperoleh fraksi etil asetat, fraksi tersebut dipisahkan dari residu lalu dipekatkan. Ketiga fraksi dan residu yang diperoleh kemudian diuji aktivitas antibakteri guna mengetahui fraksi yang memiliki aktivitas terbaik.



Gambar 3.2 Skema Fraksinasi Bertingkat Daun Anyang-Anyang

3.7.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan menggunakan plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

a. Identifikasi Alkaloid

Ekstrak atau fraksi sebesar 50 mg ditambahkan dengan metanol. Dilakukan penotolan pada plat KLT kemudian dieluasi dengan fase gerak toluen : etil asetat : metanol (7:2:1). Lalu plat disemprot dengan reagen Dragendroff, bila terdapat warna jingga kemerahan maka diindikasikan terdapat alkaloid.

b. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak atau fraksi sebanyak 50 mg dilarutkan dengan metanol. Larutan tersebut ditotolkan dan dieluasi dengan fase gerak butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5). Fase gerak akan memisah dan menjadi 2 lapisan. Lapisan atas digunakan untuk eluasi. Setelah plat KLT kering, diberi uap ammonia bila timbul warna kuning maka terdapat flavonoid.

c. Identifikasi Polifenol

Ekstrak atau fraksi sebanyak 50 mg dilarutkan dengan metanol. Larutan tersebut ditotolkan dan dieluasi dengan fase gerak kloroform : etil asetat (1:9). Setelah plat KLT kering lalu disemprot reagen FeCl_3 dan dipanaskan 1-2 menit. Bila terdapat warna hitam maka terdapat kandungan polifenol.

d. Identifikasi Terpenoid

Ekstrak atau fraksi sebanyak 50 mg dilarutkan dengan metanol. Larutan tersebut ditotolkan dan dieluasi dengan fase gerak heksana : etil asetat (4:1). Setelah plat KLT kering lalu disemprot reagen anisaldehyd asam sulfat sambil dipanaskan 1-2 menit. Bila terdapat warna merah ungu atau ungu maka terdapat steroid bebas atau terpenoid dalam sampel.

3.8 Analisis Data

Skrining fitokimia akan memberikan hasil berupa perubahan warna terhadap ekstrak atau fraksi yang diuji. Perubahan warna nantinya disesuaikan dengan literatur yang ada sehingga diperoleh golongan senyawa dari masing-masing sampel.

Uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi akan menghasilkan data absorbansi. Besarnya penghambatan bakteri dapat dihitung dengan Rumus

3.1. Setelah diperoleh data tingkat penghambatan pertumbuhan bakteri (persen penghambatan) maka dilakukan analisis probit untuk memperoleh nilai IC₅₀.

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

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

Keterangan:

Abs = absorbansi

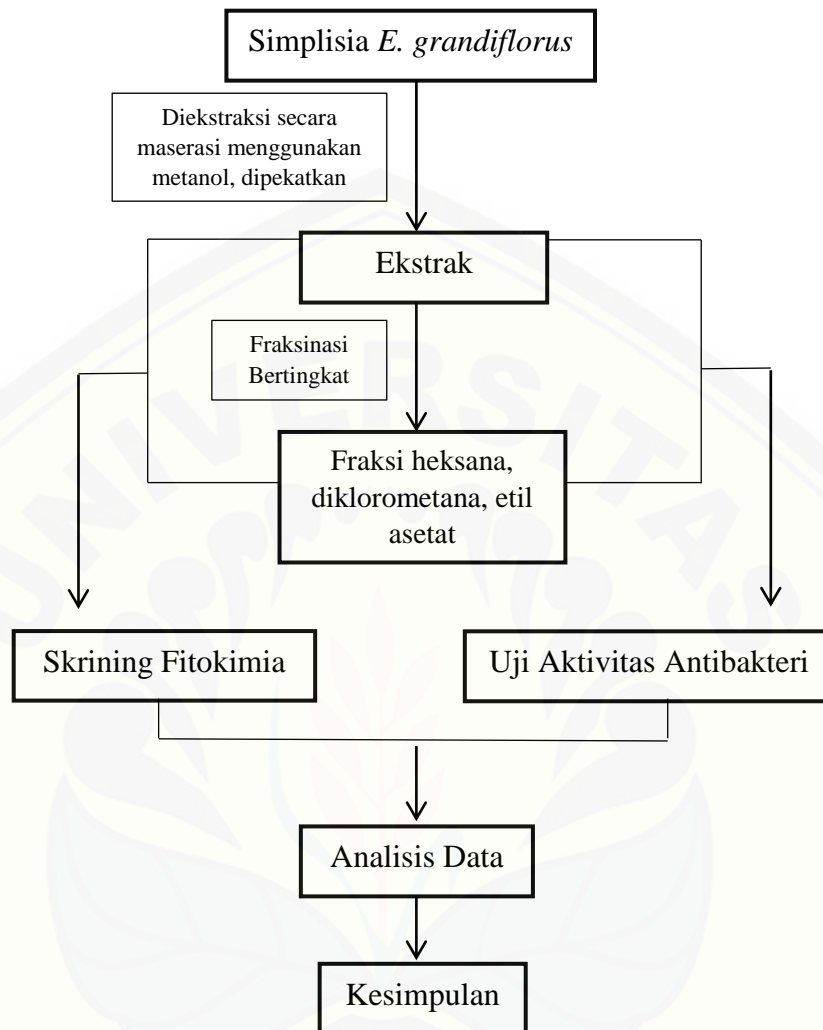
P = kontrol negatif (suspensi bakteri + DMSO 1% atau media)

Q = kontrol media (media atau DMSO 1%)

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

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

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Skema Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik berdasarkan penelitian diatas adalah:

1. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun anyang-anyang mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, polifenol, dan terpenoid. Hasil skrining fitokimia fraksi daun anyang-anyang menunjukkan bahwa fraksi heksana mengandung senyawa golongan polifenol dan terpenoid, fraksi diklorometana mengandung senyawa golongan alkaloid, polifenol, dan terpenoid, fraksi etil asetat mengandung senyawa golongan polifenol, dan residu mengandung senyawa golongan flavonoid dan polifenol.
2. Hasil uji aktivitas antibakteri daun anyang-anyang terhadap bakteri *E.coli* menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki IC_{50} sebesar $360,969 \pm 10,542 \mu\text{g/mL}$, fraksi heksana memiliki IC_{50} sebesar $1700,669 \pm 72,295 \mu\text{g/mL}$, fraksi diklorometana memiliki IC_{50} sebesar $931,392 \pm 66,736 \mu\text{g/mL}$, fraksi etil asetat memiliki IC_{50} sebesar $1082,715 \pm 67,798 \mu\text{g/mL}$, dan residu memiliki IC_{50} sebesar $1205,687 \pm 130,771 \mu\text{g/mL}$.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait:

1. Uji aktivitas antibakteri daun anyang-anyang terhadap bakteri lain terutama bakteri gram positif.
2. Dilakukan isolasi terhadap senyawa yang terkandung dalam daun anyang-anyang dan dilakukan pengujian untuk mengetahui isolat mana yang memiliki aktivitas antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Akpolat, N., T. Özekinci, dan S. Atmaca. 2001. Effect of mg+2 concentration in mueller-hinton agar on the susceptibility of pseudomonas aeruginosa to levofloxacin. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 31(6):585–586.
- Ardani, M., S. U. T. Pratiwi, dan T. Hertiani. 2010. Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai antiplak gigi. *Majalah Farmasi Indonesia*. 3(21):194.
- 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.
- Balouiri, M., M. Sadiki, dan S. K. Ibnsouda. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2):71–79.
- Barry, A. L., L. B. Reller, G. H. Miller, J. A. Washington, F. D. Schoenknect, L. R. Peterson, R. S. Hare, dan C. Knapp. 1992. Revision of standards for adjusting the cation content of mueller-hinton broth for testing susceptibility of pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(3):585–589.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*. 58(1):1–26.
- Bualee, C., A. Ounaron, dan R. Jeenapongsa. 2007. Antidiabetic and long-term effects of elaeocarpus grandiflorus. 15(1):17–28.
- Catalogue of Life. 2018. Integrated Taxonomic Information System Species 2000. <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/f27cfdaa548c8bf6e8337f94aded84a8> [Diakses pada 8 Februari 2019].
- CDC. 2018. Glossary of Terms Related to Antibiotic Resistance | NARMS | CDC. <https://www.cdc.gov/narms/resources/glossary.html> [Diakses pada 6 Februari 2019].
- CDC. 2019. E. coli (Escherichia coli) | E. coli | CDC. <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html> [Diakses pada 22 Juni 2019].
- CLSI. 2017. *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 3. *Journal of Services Marketing*.

- CLSI. 2018. Clinical and laboratory standards institute. methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *CLSI Standard M07*
- Collier, L., A. Balows, dan M. Sussman. 2010. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Cos, P., A. J. Vlietinck, D. Vanden Berghe, dan L. Maes. 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". *Journal of Ethnopharmacology*. 106(3):290–302.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 12(4):564–582.
- Cushnie, T. P. T. dan A. J. Lamb. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*. 26(5):343–356.
- Deaville, E. R., D. I. Givens, dan I. Mueller-Harvey. 2010. Chestnut and mimosa tannin silages: effects in sheep differ for apparent digestibility, nitrogen utilisation and losses. *Animal Feed Science and Technology*. 157(3–4):129–138.
- Deivasigamani, R., M. S. Devi, dan T. Nadu. 2018. Phytochemical analysis of *elaecarpus floribundus* blume. 7(10):1452–1457.
- Donnenberg, M. S. dan T. S. Whittam. 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*. 107(5):539–548.
- Elfidasari, D., A. M. Saraswati, G. Nufadianti, R. Samiah., dan V. Setiowati. 2011. Perbandingan kualitas es di lingkungan universitas al azhar indonesia dengan restoran fast food di daerah senayan dengan indikator jumlah *escherichia coli* terlarut. *Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi*. 1(1):18–23.
- Exner, M., S. Bhattacharya, B. Christiansen, J. Gebel, P. Goroncy-Bermes, P. Hartemann, P. Heeg, C. Ilschner, A. Kramer, E. Larson, W. Merkens, M. Mielke, P. Oltmanns, B. Ross, M. Rotter, R. M. Schmithausen, H.-G. Sonntag, dan M. Trautmann. 2017. Antibiotic resistance: what is so special about multidrug-resistant gram-negative bacteria? *GMS hygiene and infection control*. 12:Doc05.
- Ferreira, D., G. G. Gross, A. E. Hagerman, H. Kolodziej, dan T. Yoshida. 2008. Tannins and related polyphenols: perspectives on their chemistry, biology, ecological effects, and human health protection. *Phytochemistry*. 69(18):3006–3008.

- Goun, E., G. Cunningham, D. Chu, C. Nguyen, dan D. Miles. 2003. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Fitoterapia*. 74(6):592–596.
- Guittat, L., P. Alberti, F. Rosu, S. Van Miert, E. Thetiot, L. Pieters, V. Gabelica, E. De Pauw, A. Ottaviani, J.-F. Riou, dan J.-L. Mergny. 2003. Interactions of cryptolepine and neocryptolepine with unusual DNA structures. *Biochimie*. 85(5):535–547.
- Gul, R., S. U. Jan, S. Faridullah, S. Sherani, dan N. Jahan. 2017. Preliminary phytochemical screening, quantitative analysis of alkaloids, and antioxidant activity of crude plant extracts from *ephedra intermedia* indigenous to Balochistan. *The Scientific World Journal*. 2017:1–7.
- Harborne, J. B. 1998. *Phytochemical Methods; A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Houghton, P. J. dan A. Raman. 1998. *General methods*. Dalam *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Boston, MA: Springer US.
- Houghton, P. J. dan A. Raman. 2011. Analysis of crude extracts, fractions and isolated compounds. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. 113–138.
- Irwan, A. S. 2017. Uji Aktivitas Antimikroba Hasil Fraksinasi Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) Terhadap Bakteri Patogen. Makassar: Universitas Alauddin Makassar.
- Jang, J., H. G. Hur, M. J. Sadowsky, M. N. Byappanahalli, T. Yan, dan S. Ishii. 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*. 123(3):570–581.
- Keller, P. A. dan A. S. Nugraha. 2011. *Revealing indigenous Indonesian traditional medicine: anti-infective agents*
- Kolarević, S., D. Milovanović, dan M. A. Bot. 2016. Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. *Botanica Serbica*. 40(1):29–36.
- Kurniawati, A. F., P. Satyabakti, dan N. Arbianti. 2015. Perbedaan risiko multidrug resistance organisms (MDRO) menurut faktor risiko dan kepatuhan hand hygiene risk difference of multidrug resistance organisms (MDRO) according to risk factor and hand hygiene compliance. *Jurnal Berkala Epidemiologi*. 3(3):277–289.
- Kusumoto, I. T., I. Shimada, N. Kakiuchi, M. Hattori, T. Namba, dan S. Supriyatna. 1992. Inhibitory effects of Indonesian plant extracts on reverse

- transcriptase of an rna tumour virus (i). *Phytotherapy Research*. 6(5):241–244.
- Lancini, G., F. Parenti, dan G. G. Gallo. 1995. *Antibiotics : a multidisciplinary approach*. Plenum Press.
- Mandal, S. C., V. Mandal, dan A. K. Das. 2015. *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications*. *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications*.
- National Parks Board Singapore. 2013. Flora Fauna Web - Plant Detail - *Elaeocarpus grandiflorus* Sm. <https://florafaunaweb.nparks.gov.sg/special-pages/plant-detail.aspx?id=2870> [Diakses pada 8 Februari 2019].
- Njateng, G. S. S., Z. Du, D. Gatsing, R. S. Mouokeu, Y. Liu, H.-X. Zang, J. Gu, X. Luo, dan J.-R. Kuate. 2017. Antibacterial and antioxidant properties of crude extract, fractions and compounds from the stem bark of *Polyscias fulva* Hiern (Araliaceae). *BMC complementary and alternative medicine*. 17(1):99.
- 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.
- Rahayu, E., N. Dewi, dan F. Bodijantoro. 2017. Profile of *Elaeocarpus grandiflorus* and *Ziziphus mauritiana* as identity plants of Salatiga and Tegal towns, Central Java Province, Indonesia. *Journal of Physics*
- Rahman, A. 1997. Isolasi dan identifikasi senyawa antimikroba dari daun *Elaeocarpus grandiflorus* J.E. Smith
- Rajeswari, M. dan T. Nadu. 2018. Phytochemical screening of the various extracts of the plant *Elaeocarpus tuberculatus* Roxb .
- Saifudin, A., T. Usia, S. AbLallo, H. Morita, K. Tanaka, dan Y. Tezuka. 2016. Potent water extracts of Indonesian medicinal plants against PTP1B. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6(1):38–43.
- Salehi, B., N. V. A. Kumar, B. Şener, M. Sharifi-Rad, M. Kılıç, G. B. Mahady, S. Vlaisavljevic, M. Iriti, F. Kobarfard, W. N. Setzer, S. A. Ayatollahi, A. Ata, dan J. Sharifi-Rad. 2018. Medicinal plants used in the treatment of human immunodeficiency virus. *International journal of molecular sciences*. 19(5)
- Sayuti, M. 2017. Pengaruh perbedaan metode ekstraksi, bagian dan jenis pelarut terhadap rendemen dan aktifitas antioksidan bambu laut (*Isis hippuris*). *Technology Science and Engineering Journal*. 1(3):166–174.
- Shah, G., S. Singh, A. S. Mann, dan R. Shri. 2011. Family of *Elaeocarpaceae*.

International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences. 1(1)

Simaremare, E. S. 2014. Skrining fitokimia ekstrak etanol daun gatal (*laportea decumana* (roxb.) wedd). 11(1):98–107.

Singh, S. B., K. Young, dan L. L. Silver. 2017. What is an “ideal” antibiotic? discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*. 133:63–73.

Swari, E. 2015. *Simplisia nabati dan produk obat tradisional yang diperdagangkan di kota magelang, jawa tengah*. Institut Pertanian Bogor.

The Commision of The European Communities. 2005. *Requirements For The Determination Of Levels Of Dioxins And Dioxin-Like Pcb In Feedingstuffs Rules*

Van Middlesworth, F. dan R. J. P. Cannell. 1998. *Dereplication and Partial Identification of Natural Products*

Wagner, H. dan S. Bladt. 1996. *Plant Drug Analysis*. Edisi Kedua. Jerman: Springer-Verlag GmbH.

Walsh, C. T. 2002. Magic bullets, lost horizons: the rise and fall of antibiotics. *Nature Medicine* 2002 8:1

WHO. 2018. Who | disease, injury and causes of death country estimates, 2000-2015. *WHO*

LAMPIRAN**Lampiran 4.1 Perhitungan Rendemen Ekstrak Metanol, Fraksi Heksana, Fraksi Diklorometana, Fraksi Etil Asetat, dan Residu Daun Anyang-Anyang****1. Rendemen Ekstrak Metanol**

Penimbangan	= 20,829 g
Berat bobot + ekstrak	= 13,6939 g
Berat botol kosong	= 11,1102 g
Berat Ekstrak	= 2,5837 g
Rendemen	$= \frac{\text{berat ekstrak kering}}{\text{berat serbuk awal}} \times 100\%$ $= \frac{2,5837 \text{ g}}{20,829 \text{ g}} \times 100\%$ $= 12,404\%$

2. Rendemen Fraksi Heksana

Berat ekstrak untuk fraksinasi	= 1,0988 gram
Berat wadah + fraksi heksana	= 11,4095 gram
Berat wadah kosong	= 11,3120 gram
Fraksi heksana	= 0,0975 gram
Rendemen fraksi heksana	$= \frac{\text{berat fraksi}}{\text{berat serbuk awal}} \times 100\%$ $= \frac{0,0975 \text{ gram}}{20,829 \text{ gram}} \times 100\%$ $= 0,468 \%$

3. Rendemen Fraksi Diklorometana

$$\begin{aligned}
 \text{Berat ekstrak untuk fraksinasi} &= 1,0988 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah + fraksi diklorometana} &= 11,3457 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah kosong} &= 11,2627 \text{ gram} \\
 \text{Fraksi diklorometana} &= 0,083 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen fraksi diklorometana} &= \frac{\text{berat fraksi}}{\text{berat serbuk awal}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,083 \text{ gram}}{20,829 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 0,398 \%
 \end{aligned}$$

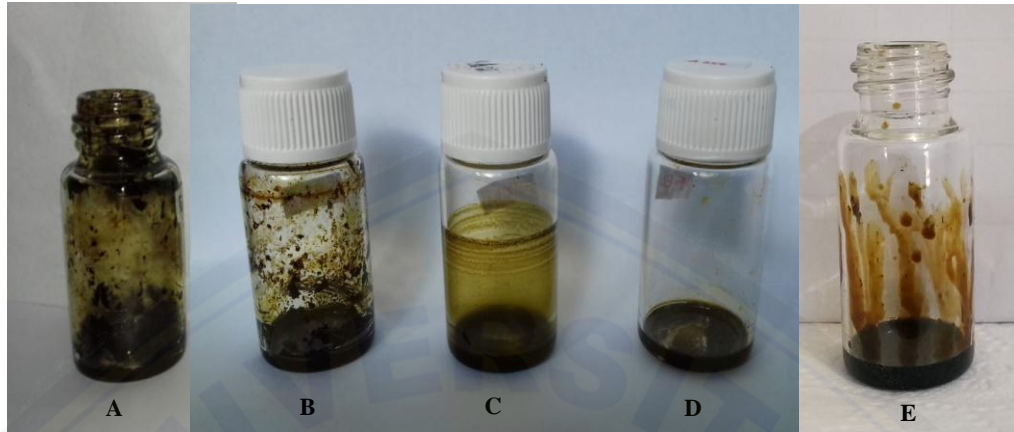
4. Rendemen Fraksi Etil Asetat

$$\begin{aligned}
 \text{Berat ekstrak untuk fraksinasi} &= 1,0988 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah + fraksi etil asetat} &= 11,2964 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah kosong} &= 11,1913 \text{ gram} \\
 \text{Fraksi etil asetat} &= 0,1051 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen fraksi etil asetat} &= \frac{\text{berat fraksi}}{\text{berat serbuk awal}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,1051 \text{ gram}}{20,829 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 0,504 \%
 \end{aligned}$$

5. Rendemen Residu

$$\begin{aligned}
 \text{Berat ekstrak untuk fraksinasi} &= 1,0988 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah + residu kering} &= 11,5159 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah kosong} &= 10,9940 \text{ gram} \\
 \text{Fraksi residu kering} &= 0,5219 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen residu} &= \frac{\text{berat fraksi}}{\text{berat serbuk awal}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,5219 \text{ gram}}{20,829 \text{ gram}} \times 100\%
 \end{aligned}$$

= 2,505 %



Gambar A) ekstrak metanol, B) fraksi heksana, C) fraksi diklorometana, D) fraksi etil asetat, E) residu

Lampiran 4.2 Perhitungan Pembuatan Media CAMHB

1. Pembuatan media

Dibuat media sebanyak 80 mL

Penimbangan media MHB = 1,78 gram

2. Penambahan MgCl₂ ke dalam media CAMHB

Bahan = MgCl₂.6H₂O (Berat molekul = 203,3027 g/mol)

Berat molekul MgCl₂ = 95,211 g/mol

Berat molekul Mg²⁺ = 24,305 g/mol

Dibutuhkan larutan induk MgCl₂ dengan konsentrasi 10 mg Mg²⁺/mL.

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

Dibuat dalam 10 mL akuades maka MgCl₂ yang dibutuhkan adalah 391,23 mg

$$\begin{aligned} \text{Jumlah MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \text{ dibutuhkan} &= \frac{203,303}{95,211} \times 391,23 \text{ mg} \\ &= 836,466 \text{ mg} \end{aligned}$$

Berdasarkan CLSI konsentrasi Mg²⁺ dalam media adalah 10-12,5 mg Mg²⁺/ L, maka Mg²⁺ yang dibutuhkan dalam 80 mL media sebanyak:

$$\frac{80 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 10 - 12,5 \text{ mg} = 0,8 - 1 \text{ mg Mg}^{2+}$$

Penambahan Mg²⁺ dilakukan dengan menggunakan larutan induk MgCl₂.6H₂O sehingga larutan induk yang perlu dipipet untuk mendapat konsentrasi 0,8-1 mg Mg²⁺ dalam 80 mL media sebesar

$$\frac{0,8 - 1 \text{ mg Mg}^{2+}}{10 \text{ mg Mg}^{2+}} \times 1 \text{ mL} = 0,08 - 0,1 \text{ mL}$$

3. Penambahan CaCl_2 ke dalam media CAMHB

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.

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

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

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

Berdasarkan CLSI konsentrasi Ca^{2+} dalam media adalah 20-25 mg Ca^{2+} /L, maka dalam 80 mL media dibutuhkan Ca^{2+} sebanyak:

$$\frac{80 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 20 - 25 \text{ mg } \text{Ca}^{2+} = 1,6 - 2 \text{ mg } \text{Ca}^{2+}$$

Penambahan Ca^{2+} dilakukan dengan menggunakan larutan induk $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sehingga larutan induk yang perlu dipipet untuk mendapat konsentrasi 1,6-2 mg Ca^{2+} dalam 80 mL media adalah:

$$\frac{1,6-2 \text{ mg } \text{Ca}^{2+}}{10 \text{ mg } \text{Ca}^{2+}} \times 1 \text{ mL} = 0,16 - 0,2 \text{ mL}$$

Lampiran 4.3 Perhitungan Konsentrasi Kontrol Positif Gentamisin

Konsentrasi gentamisin dalam larutan injeksi = 40 mg/ml = 40.000 µg/ml

Konsentrasi yang akan dibuat adalah 4 µg/ml; 2 µg/ml; 1 µg/ml; dan 0,5 µg/ml.

Dibutuhkan larutan induk dengan konsentrasi 160 µg/ml :

$$160 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 2000 \mu\text{L} = 40.000 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times \text{volume yang dibutuhkan}$$

$$\text{Volume yang dibutuhkan} = 8 \mu\text{L}$$

$$= 8 \mu\text{L ad } 2000 \mu\text{L dengan media CAMHB}$$

Pengenceran konsentrasi menggunakan pengenceran bertingkat dengan media CAMHB:

Konsentrasi Awal (µg/ml)	Volume larutan induk yang diambil (µl)	Volume CAMHB yang ditambahkan (µl)	Konsentrasi Akhir (µg/ml)
160	100	1900	8
8	1000	1000	4
4	1000	1000	2
2	1000	1000	1
1	1000	1000	0,5

Lampiran 4.4 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Metanol, Fraksi Heksana, Fraksi Diklorometana, Fraksi Etil Asetat dan Residu Daun Anyang-Anyang

Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun anyang-anyang dilakukan dengan 5 konsentrasi yakni 2048 µg/mL, 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, dan 128 µg/mL.

$$\begin{aligned} \text{Penimbangan ekstrak dan fraksi} &= \frac{10,24 \text{ mg}}{0,05 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} \\ &= 204.800 \text{ µg/mL} \end{aligned}$$

Ekstrak dan fraksi sebanyak 10,24 mg dilarutkan dalam 0,05 mL DMSO 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)
204.800	25	25	102.400
102.400	25	25	51.200
51.200	25	25	25.600
25.600	25	25	12.800
12.800	25	25	6.400

Selanjutnya ekstrak dan 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)
204.800	15		1485	2048
102.400	15		1485	1024
51.200	15		1485	512
25.600	15		1485	256
12.800	15		1485	128

Lampiran 4.5 Data Hasil dan Persentase Penghambatan Kontrol Negatif/DMSO terhadap Pertumbuhan Bakteri *E. coli*

1. Data Absorbansi Kontrol Negatif dan Kontrol Media

a. Data Absorbansi Kontrol Negatif dan Kontrol Media untuk Ekstrak dan Fraksi

	Kontrol negatif (DMSO 1% + Bakteri)			Kontrol media (DMSO 1% + Media)		
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3
Abs	1,023	1,059	1,149	0,090	0,114	0,110
	1,095	1,013	1,178	0,100	0,108	0,113
	1,005	1,149	1,138	0,086	0,115	0,143
Rerata	1,077	1,095	1,097	0,105	0,107	0,115

Abs = absorbansi

Rep = replikasi

b. Data Absorbansi Kontrol Negatif dan Kontrol Media DMSO 1%

	Kontrol negatif (Media + Bakteri)			Kontrol media (Media)		
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3
Abs	0,920	0,978	0,938	0,159	0,155	0,152
	1,019	1,019	1,152	0,159	0,155	0,159
	1,013	1,023	1,013	0,161	0,163	0,163
Rerata	0,984	1,007	0,985	0,160	0,158	0,158

Abs = absorbansi

Rep = replikasi

c. Persentase penghambatan pertumbuhan bakteri oleh DMSO 1%

Replikasi	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)	Rerata (%)	SD (%)	CV (%)
1	-17,954			
2	-16,411	-17,714	1,200	6,775
3	-18,775			

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

a. Data absorbansi kontrol negatif dan kontrol media untuk gentamisin

	Kontrol negatif (media CAMHB + bakteri)			Kontrol media (media CAMHB)		
	Replikasi			Replikasi		
	1	2	3	1	2	3
Abs	0,920	1,019	1,013	0,159	0,159	0,161
	0,978	1,019	1,023	0,155	0,155	0,163
	0,938	1,013	1,005	0,152	0,159	0,163
Rerata	0,984	1,007	0,985	0,160	0,158	0,158

Abs = Absorbansi

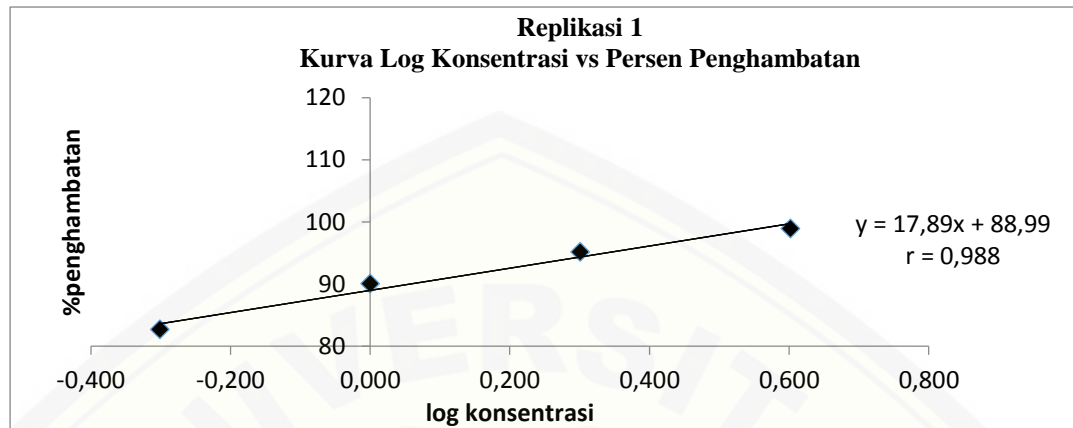
b. Hasil Uji Aktivitas Gentamisin

Konsentrasi gentamisin ($\mu\text{g/ml}$)	Pengujian gentamisin			Kontrol gentamisin		
	Replikasi	Replikasi	Replikasi	Replikasi	Replikasi	Replikasi
	1	2	3	1	2	3
0,5	0,253	0,243	0,236	0,110	0,110	0,110
1	0,195	0,189	0,188	0,113	0,113	0,113
2	0,164	0,160	0,160	0,124	0,124	0,123
4	0,144	0,143	0,133	0,135	0,135	0,134

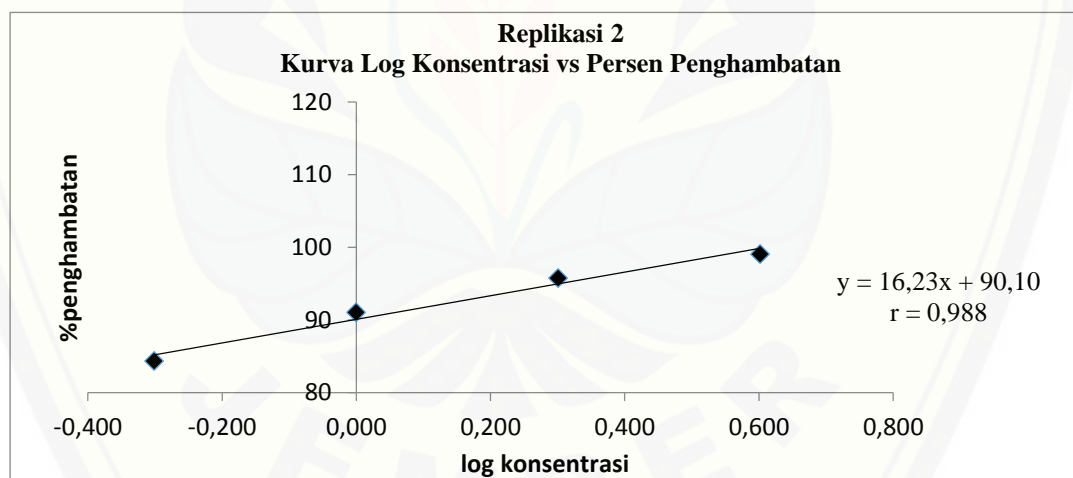
Konsentrasi gentamisin ($\mu\text{g/ml}$)	% penghambatan bakteri		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
0,5	82,653	84,335	84,770
1	90,053	91,048	90,935
2	95,148	95,760	95,528
4	98,908	99,058	100,121

Konsentrasi gentamisin ($\mu\text{g/ml}$)	Log Konsentrasi	Rerata	SD (%)	CV (%)
		Penghambatan Pertumbuhan Bakteri (%)		
0,5	-0,301	83,919	1,118	1,332
1	0	90,678	0,545	0,601
2	0,301	95,478	0,309	0,324
4	0,602	99,362	0,661	0,666

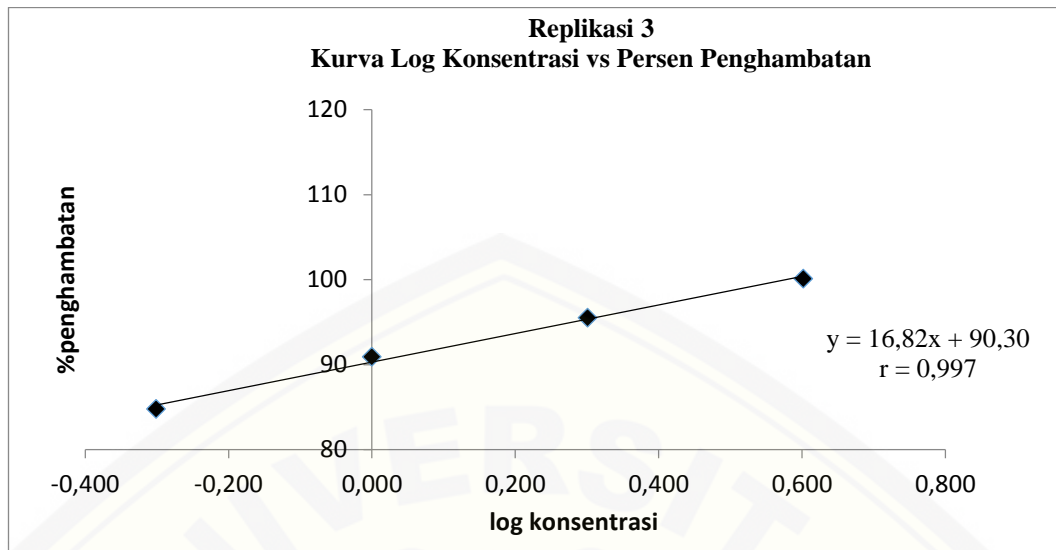
c. Kurva pengaruh konsentrasi gentamisin terhadap persentase penghambatan pertumbuhan bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 4$, adalah 0,950
2. $r = 0,988 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi gentamisin



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 4$, adalah 0,950
2. $r = 0,988 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi gentamisin



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 4$, adalah 0,950
2. $r = 0,997 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi gentamisin.

Lampiran 4.7 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Anyang-Anyang

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	0,325	0,258		93,109
1024	0,451	0,203		74,426
512	0,729	0,175	1,077	43,024
256	0,766	0,160		37,641
128	0,775	0,128		33,459

Contoh perhitungan persentase penghambatan pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 2048 $\mu\text{g/mL}$ (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)

$$\% \text{ penghambatan} = \left(1 - \frac{(0,325 - 0,258)}{(1,077 - 0,105)}\right) \times 100\% = 93,109\%$$

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif	
2048	0,325	0,262		93,457
1024	0,459	0,195		75,898
512	0,718	0,177	1,095	44,654
256	0,766	0,156		38,482
128	0,763	0,126		35,582

Replikasi 3

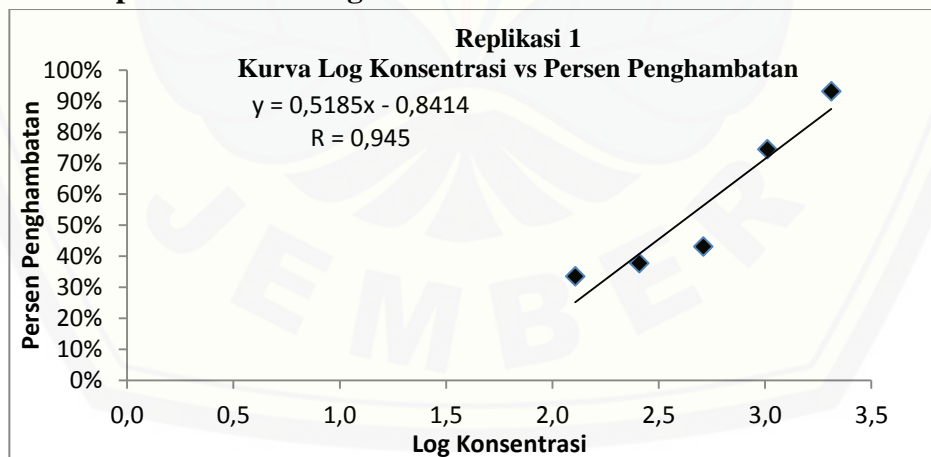
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif	
2048	0,318	0,261		93,577
1024	0,432	0,220		78,358
512	0,715	0,172	1,097	44,708
256	0,779	0,153		36,296
128	0,781	0,128		33,548

b. Persentase penghambatan pertumbuhan bakteri

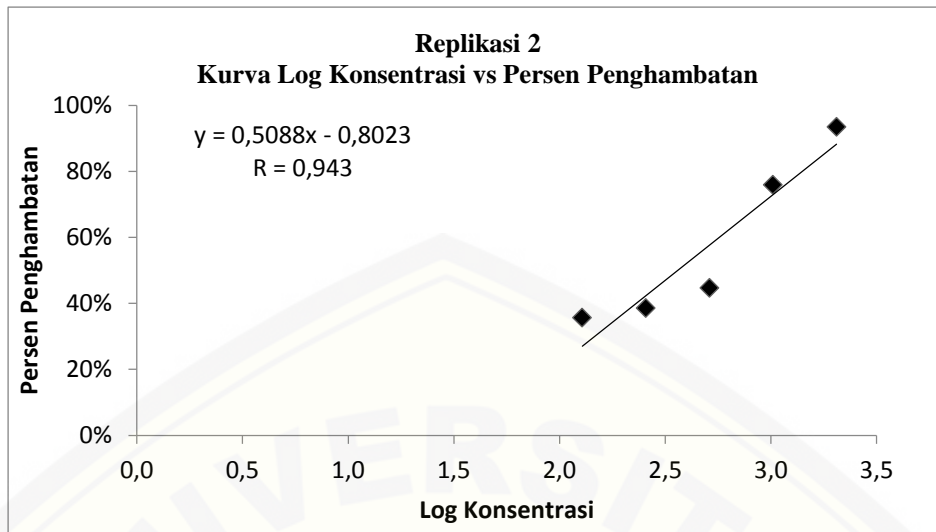
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Log Konsentrasi	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)				SD (%)	CV (%)
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rerata		
2048	3,311	93,109	93,457	93,577	93,381	0,538	0,575
1024	3,010	74,426	75,898	78,358	76,227	1,987	2,606
512	2,709	43,024	44,654	44,708	44,129	0,957	2,170
256	2,408	37,641	38,482	36,296	37,473	1,103	2,943
128	2,107	33,459	35,582	33,548	34,196	1,201	3,511

Rep = replikasi

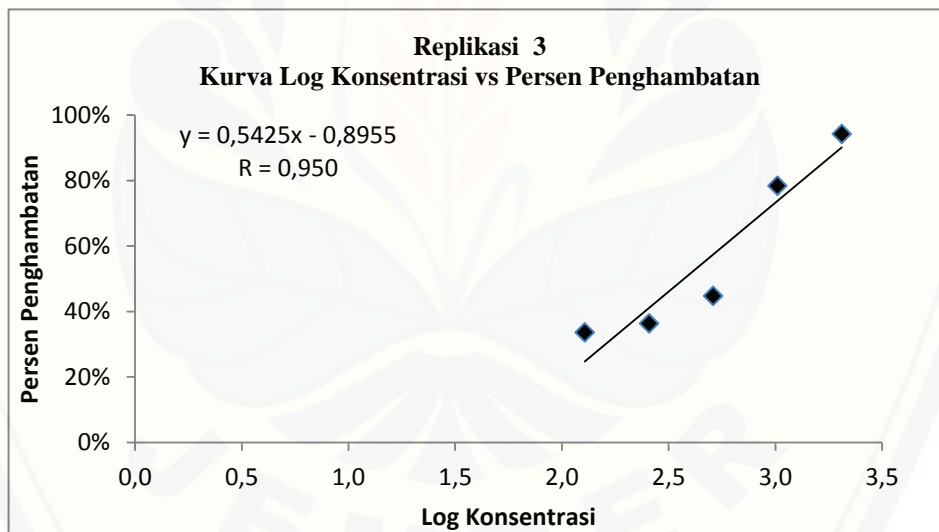
c. Kurva Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Metanol Daun Anyang-Anyang terhadap Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,945 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi ekstrak.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,943 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi ekstrak.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,950 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi ekstrak.

Lampiran 4.8 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Heksana Daun Anyang-Anyang

a. Data Hasil dan Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi				Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif	Kontrol Media	
2048	0,828	0,346			50,394
1024	0,835	0,267			42,232
512	0,843	0,217	1,077	0,105	36,627
256	0,943	0,193			22,866
128	1,002	0,169			16,730

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi				Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif	Kontrol Media	
2048	0,822	0,339			50,848
1024	0,835	0,269			42,732
512	0,837	0,213	1,095	0,107	36,830
256	0,952	0,190			22,867
128	1,009	0,166			14,739

Replikasi 3

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi				Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif	Kontrol Media	
2048	0,827	0,347			51,153
1024	0,838	0,275			42,707
512	0,840	0,218	1,097	0,115	36,737
256	0,951	0,191			22,659
128	1,010	0,163			13,806

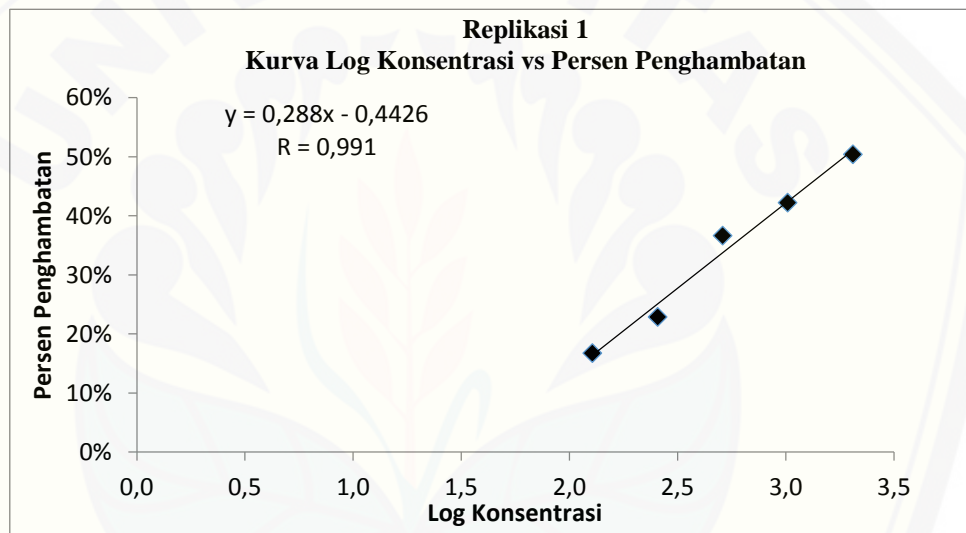
b. Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Log Konsentrasi	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)				SD (%)	CV (%)
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rerata		
2048	3,311	50,394	50,848	51,153	50,799	0,382	0,752
1024	3,010	42,232	42,732	42,707	42,557	0,282	0,662

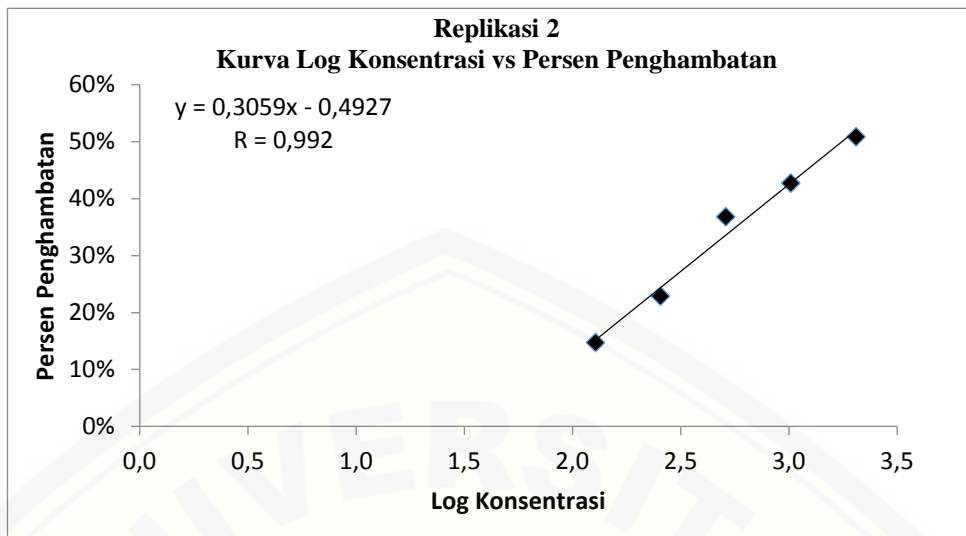
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Log Konsentrasi	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)				SD (%)	CV (%)
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rerata		
512	2,709	36,627	36,830	36,737	36,731	0,101	0,276
256	2,408	22,866	22,867	22,659	22,797	0,119	0,524
128	2,107	16,730	14,739	13,806	15,091	1,493	9,895

Rep = replikasi

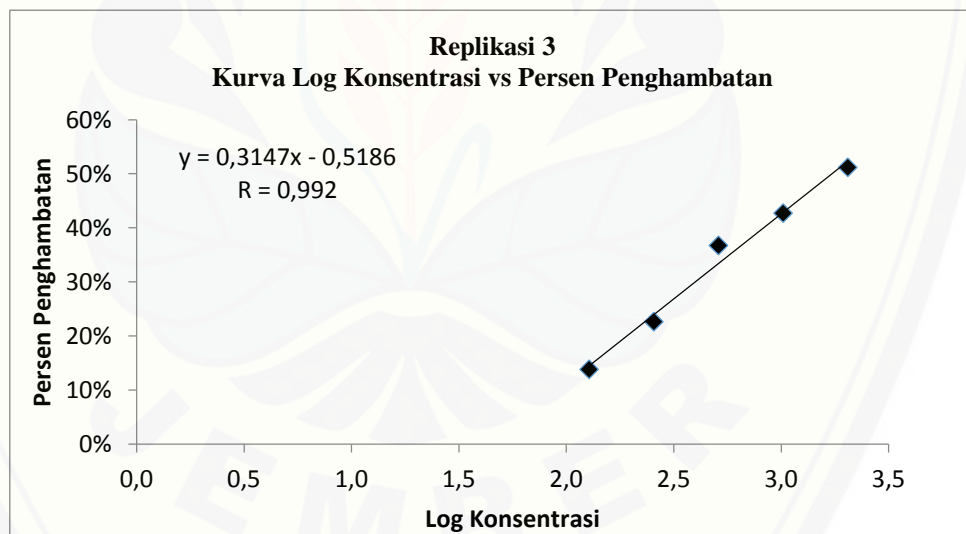
c. Kurva Pengaruh Konsentrasi Fraksi Heksana Daun Anyang-Anyang terhadap Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,991 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi heksana.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,991 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi heksana.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,992 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi heksana.

Lampiran 4.9 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Diklorometana Daun Anyang-Anyang

a. Data Hasil dan Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Kontrol Media	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif		
2048	0,620	0,216			58,416
1024	0,635	0,139			49,023
512	0,628	0,106	1,077	0,105	46,280
256	0,780	0,093			29,311
128	0,816	0,088			25,129

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Kontrol Media	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif		
2048	0,613	0,217			59,865
1024	0,628	0,138			50,455
512	0,634	0,109	1,095	0,107	46,847
256	0,759	0,094			32,715
128	0,780	0,088			30,051

Replikasi 3

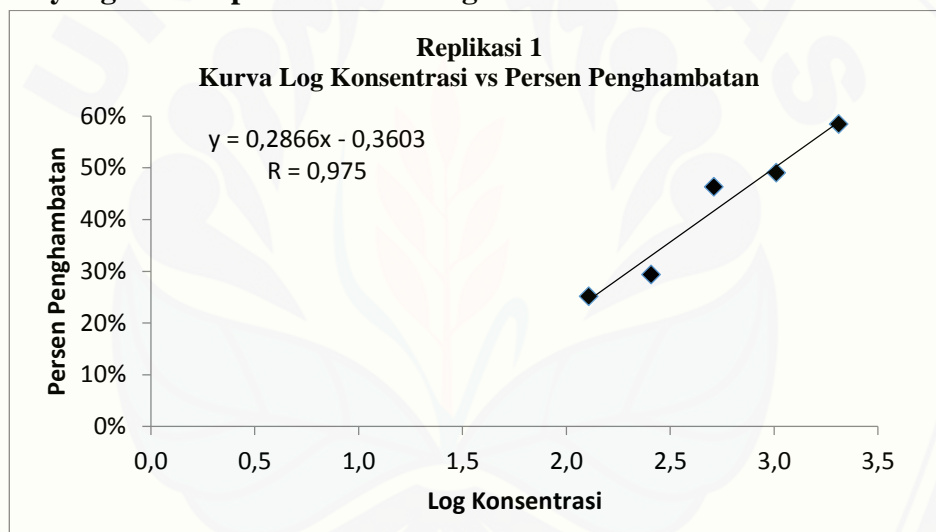
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Kontrol Media	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif		
2048	0,618	0,218			59,294
1024	0,627	0,139			50,407
512	0,635	0,109	1,097	0,115	46,472
256	0,754	0,094			32,904
128	0,781	0,090			29,647

b. Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri

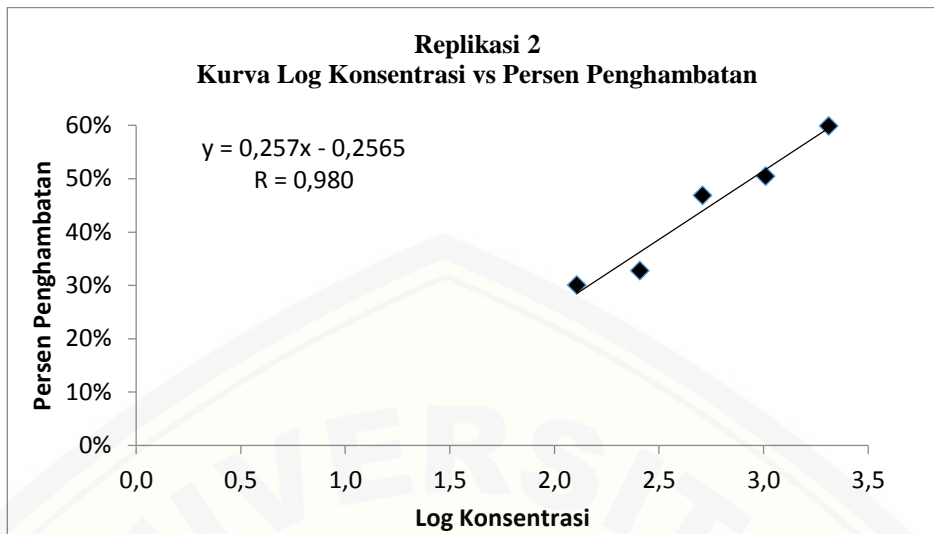
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Log Konsentrasi	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)				SD (%)	CV (%)
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rerata		
2048	3,311	58,416	59,865	59,294	59,192	0,730	1,233
1024	3,010	49,023	50,455	50,407	49,962	0,813	1,628
512	2,709	46,280	46,847	46,472	46,533	0,288	0,619
256	2,408	29,311	32,715	32,904	31,643	2,022	6,390
128	2,107	25,129	30,051	29,647	28,275	2,733	9,665

Rep = replikasi

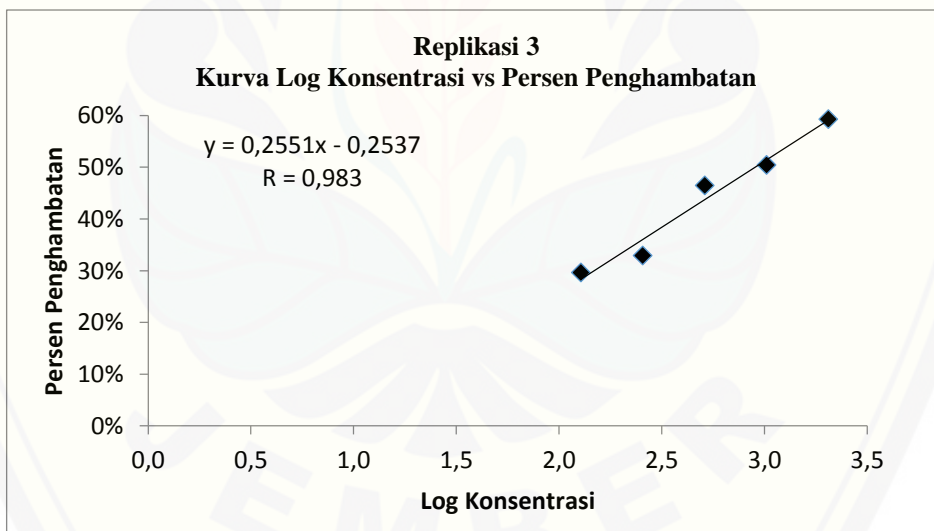
c. Kurva Pengaruh Konsentrasi Fraksi Diklorometana Daun Anyang-Anyang terhadap Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,975 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi diklorometana.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,980 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi diklorometana.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,983 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi diklorometana.

Lampiran 4.10 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Daun Anyang-Anyang

a. Data Hasil dan Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri

Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Kontrol Media	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif		
2048	0,669	0,242			56,051
1024	0,693	0,208			50,086
512	0,733	0,156	1,077	0,105	40,658
256	0,789	0,114			30,579
128	0,812	0,094			26,157

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Kontrol Media	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif		
2048	0,665	0,250			57,976
1024	0,695	0,216			51,467
512	0,731	0,153	1,095	0,107	41,518
256	0,786	0,112			31,771
128	0,819	0,092			26,442

Replikasi 3

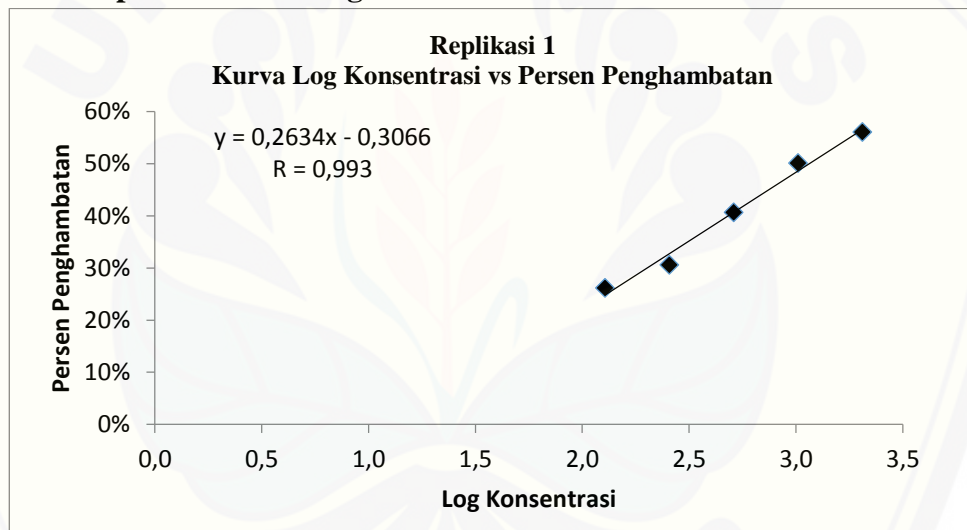
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Kontrol Media	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif		
2048	0,664	0,243			57,976
1024	0,703	0,214			50,170
512	0,733	0,155	1,097	0,115	41,214
256	0,781	0,120			32,802
128	0,816	0,088			25,916

b. Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri

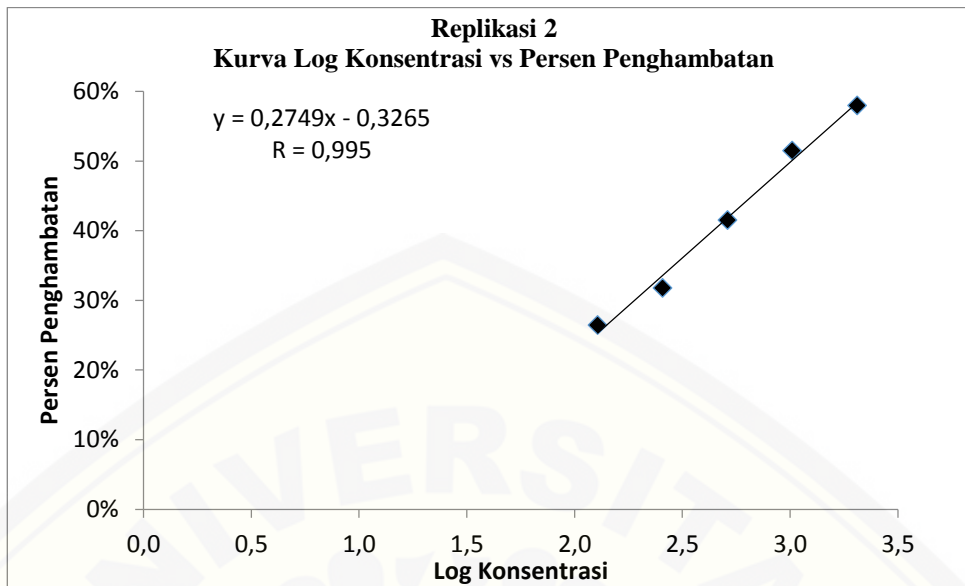
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Log Konsentrasi	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)				SD (%)	CV (%)
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rerata		
2048	3,311	56,051	57,976	57,976	57,073	0,968	1,697
1024	3,010	50,086	51,467	50,170	50,574	0,774	1,531
512	2,709	40,658	41,518	41,214	41,130	0,436	1,060
256	2,408	30,579	31,771	32,802	31,717	1,112	3,507
128	2,107	26,157	26,442	25,916	26,172	0,263	1,006

Rep = replikasi

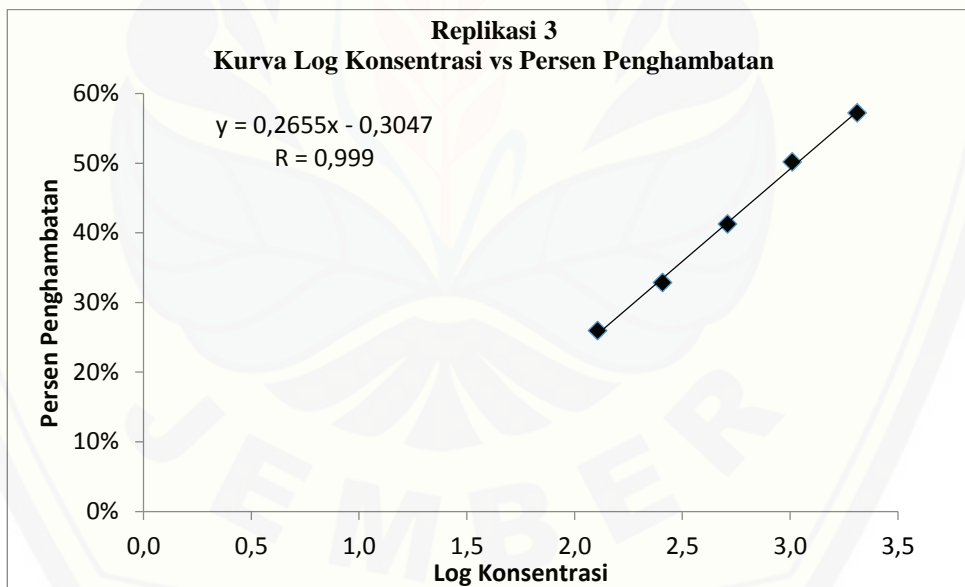
c. Kurva Pengaruh Konsentrasi Fraksi Etil Asetat Daun Anyang-Anyang terhadap Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,993 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi diklorometana.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,995 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi diklorometana.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,999 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi diklorometana.

Lampiran 4.11 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Residu Daun Anyang-Anyang

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	0,627	0,085		56,565
1024	0,684	0,098		44,326
512	0,709	0,115	1,077	38,944
256	0,746	0,142		33,288
128	0,799	0,205		26,568

Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif	
2048	0,619	0,210		58,583
1024	0,685	0,146		45,464
512	0,691	0,118	1,095	41,990
256	0,738	0,100		35,413
128	0,791	0,087		28,702

Replikasi 3

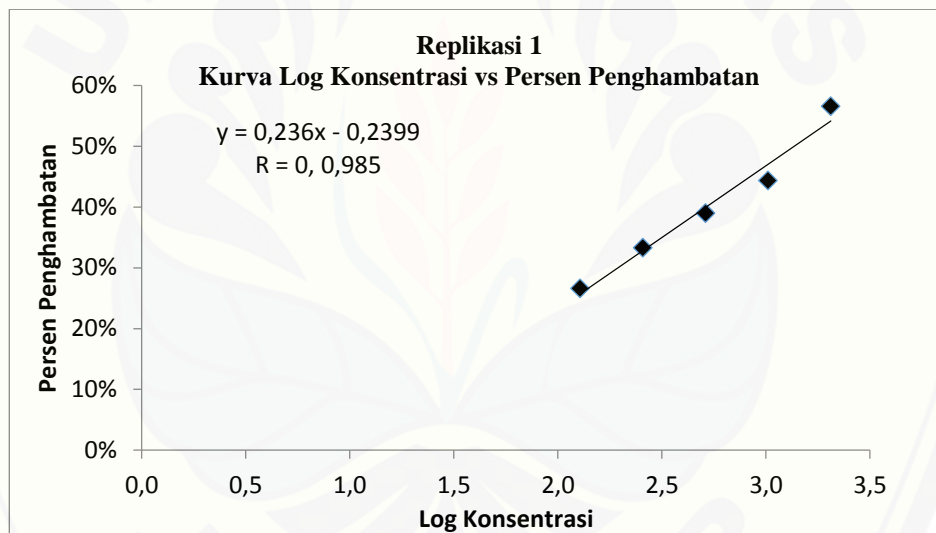
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
	Uji	Kontrol Uji	Kontrol Negatif	
2048	0,622	0,200		57,090
1024	0,675	0,161		47,727
512	0,701	0,120	1,097	40,875
256	0,739	0,102		35,210
128	0,795	0,089		28,189

b. Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri

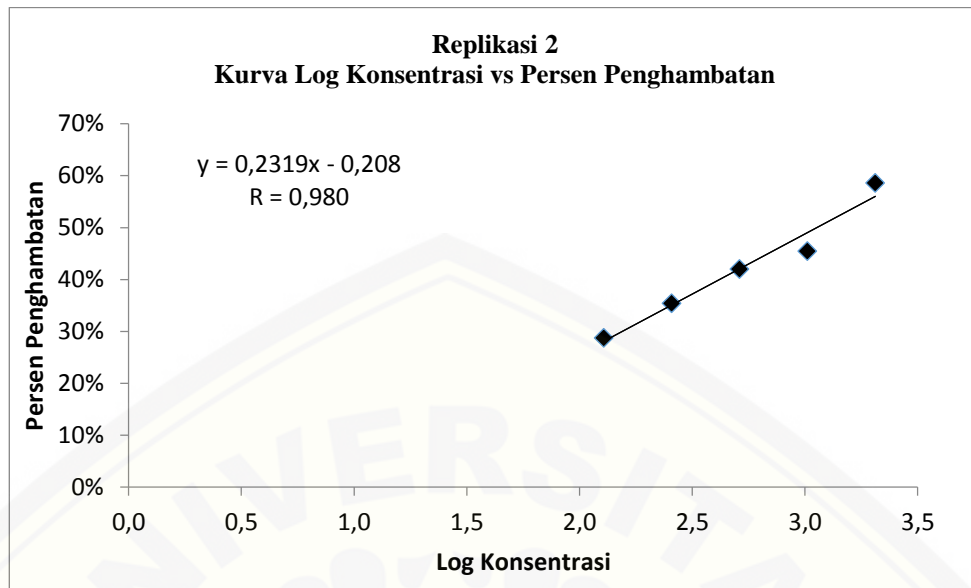
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Log Konsentrasi	Penghambatan pertumbuhan bakteri (%)				SD (%)	CV (%)
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rerata		
2048	3,311	56,565	58,583	57,090	57,413	1,047	1,824
1024	3,010	44,326	45,464	47,727	45,839	1,731	3,777
512	2,709	38,944	41,990	40,875	40,603	1,541	3,795
256	2,408	33,288	35,413	35,210	34,637	1,173	3,387
128	2,107	26,568	28,702	28,189	27,820	1,113	4,002

Rep = replikasi

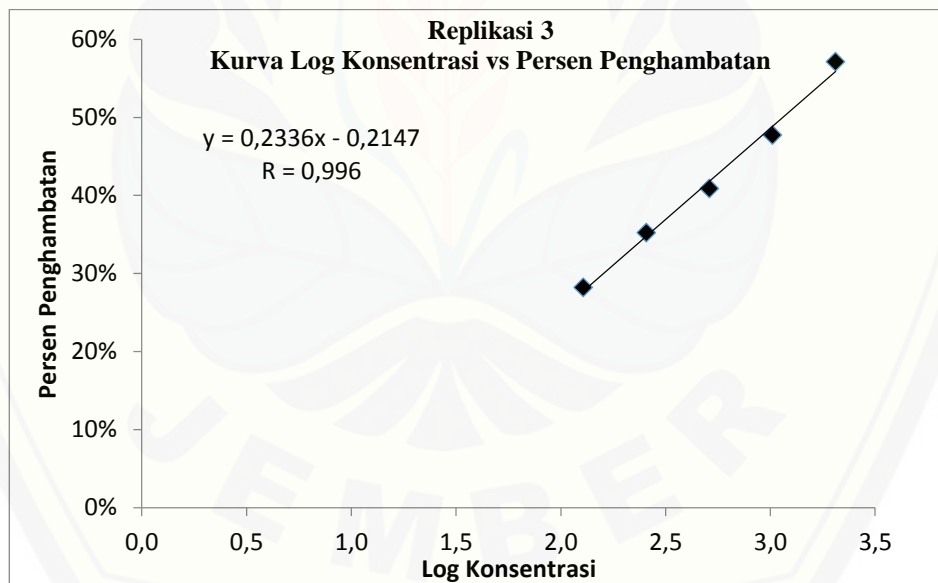
c. Kurva Pengaruh Konsentrasi Residu Daun Anyang-Anyang terhadap Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,985 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi diklorometana.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,980 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi diklorometana.



1. Nilai r tabel untuk taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$), $n = 5$, adalah 0,878.
2. $r = 0,985 > r$ tabel, artinya terdapat hubungan yang linier antara persen penghambatan bakteri dengan konsentrasi fraksi diklorometana.

Lampiran 4.12 IC₅₀ Ekstrak MetanolPenentuan IC₅₀ Ekstrak Metanol Daun Anyang-Anyang terhadap *E. coli* menggunakan Analisis Probit

Replikasi 1

Probability	95% Confidence Limits for KONSENTRASI			95% Confidence Limits for log(KONSENTRASI) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a ,010	10,562	,000	62,168	1,024	-5,934	1,794
,020	16,032	,000	79,173	1,205	-4,990	1,899
,030	20,892	,000	92,443	1,320	-4,392	1,966
,040	25,496	,000	103,976	1,406	-3,943	2,017
,050	29,981	,000	114,501	1,477	-3,577	2,059
,060	34,414	,001	124,377	1,537	-3,267	2,095
,070	38,837	,001	133,811	1,589	-2,994	2,126
,080	43,278	,002	142,940	1,636	-2,751	2,155
,090	47,756	,003	151,857	1,679	-2,530	2,181
,100	52,287	,005	160,631	1,718	-2,326	2,206
,150	76,097	,033	203,945	1,881	-1,487	2,310
,200	102,539	,150	249,135	2,011	-,824	2,396
,250	132,438	,548	299,426	2,122	-,261	2,476
,300	166,649	1,730	358,776	2,222	,238	2,555
,350	206,192	4,907	433,670	2,314	,691	2,637
,400	252,358	12,766	536,659	2,402	1,106	2,730
,450	306,840	30,535	695,455	2,487	1,485	2,842
,500	371,929	66,070	978,570	2,570	1,820	2,991
,550	450,826	125,448	1569,122	2,654	2,098	3,196
,600	548,155	205,195	2973,478	2,739	2,312	3,473
,650	670,886	295,364	6650,986	2,827	2,470	3,823
,700	830,079	391,163	17220,346	2,919	2,592	4,236
,750	1044,502	495,492	51390,403	3,019	2,695	4,711
,800	1349,057	616,898	181467,468	3,130	2,790	5,259
,850	1817,839	771,587	815138,680	3,260	2,887	5,911
,900	2645,619	996,201	5539145,981	3,423	2,998	6,743
,910	2896,610	1056,728	8823314,107	3,462	3,024	6,946
,920	3196,335	1125,663	14644207,99	3,505	3,051	7,166
,930	3561,817	1205,554	25586098,81	3,552	3,081	7,408
,940	4019,619	1300,230	47761954,22	3,604	3,114	7,679
,950	4613,988	1415,802	97434483,69	3,664	3,151	7,989
,960	5425,521	1562,864	225433991,6	3,734	3,194	8,353
,970	6621,345	1762,134	633189554,9	3,821	3,246	8,802
,980	8628,577	2062,736	2503986025	3,936	3,314	9,399
,990	13097,320	2634,776	2,194E+10	4,117	3,421	10,341

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for KONSENTRASI			95% Confidence Limits for log(KONSENTRASI) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a ,010	8,935	,000	56,373	,951	-6,357	1,751
,020	13,737	,000	72,256	1,138	-5,377	1,859
,030	18,047	,000	84,702	1,256	-4,756	1,928
,040	22,159	,000	95,550	1,346	-4,290	1,980
,050	26,186	,000	105,469	1,418	-3,910	2,023
,060	30,185	,000	114,790	1,480	-3,588	2,060
,070	34,192	,000	123,704	1,534	-3,305	2,092
,080	38,228	,001	132,337	1,582	-3,052	2,122
,090	42,311	,002	140,775	1,626	-2,822	2,149
,100	46,454	,002	149,082	1,667	-2,611	2,173
,150	68,389	,018	190,113	1,835	-1,739	2,279
,200	92,998	,089	232,861	1,968	-1,050	2,367
,250	121,060	,344	280,225	2,083	-,463	2,448
,300	153,408	1,140	335,679	2,186	,057	2,526
,350	191,051	3,392	404,795	2,281	,530	2,607
,400	235,278	9,264	498,173	2,372	,967	2,697
,450	287,791	23,341	638,949	2,459	1,368	2,805
,500	350,901	53,489	884,369	2,545	1,728	2,947
,550	427,851	107,880	1390,826	2,631	2,033	3,143
,600	523,344	185,949	2607,403	2,719	2,269	3,416
,650	644,496	277,357	5875,664	2,809	2,443	3,769
,700	802,644	375,210	15583,562	2,905	2,574	4,193
,750	1017,114	481,555	48201,514	3,007	2,683	4,683
,800	1324,019	605,096	178088,221	3,122	2,782	5,251
,850	1800,472	762,676	845867,051	3,255	2,882	5,927
,900	2650,637	992,396	6177754,024	3,423	2,997	6,791
,910	2910,172	1054,508	10015024,06	3,464	3,023	7,001
,920	3221,000	1125,354	16943241,62	3,508	3,051	7,229
,930	3601,225	1207,601	30233639,42	3,556	3,082	7,480
,940	4079,171	1305,253	57784539,33	3,611	3,116	7,762
,950	4702,167	1424,718	121099508,9	3,672	3,154	8,083
,960	5556,716	1577,122	289210116,0	3,745	3,198	8,461
,970	6822,957	1784,268	844635044,5	3,834	3,251	8,927
,980	8963,711	2097,999	3518121794	3,952	3,322	9,546
,990	13781,056	2698,555	3,346E+10	4,139	3,431	10,524

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for KONSENTRASI			95% Confidence Limits for log(KONSENTRASI) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a ,010	12,098	,000	63,773	1,083	-4,304	1,805
,020	18,005	,000	80,669	1,255	-3,547	1,907
,030	23,171	,001	93,779	1,365	-3,067	1,972
,040	28,014	,002	105,129	1,447	-2,707	2,022
,050	32,690	,004	115,454	1,514	-2,414	2,062
,060	37,280	,007	125,116	1,571	-2,165	2,097
,070	41,832	,011	134,324	1,622	-1,946	2,128
,080	46,378	,018	143,213	1,666	-1,751	2,156
,090	50,939	,027	151,879	1,707	-1,574	2,181
,100	55,534	,039	160,388	1,745	-1,411	2,205
,150	79,403	,183	202,166	1,900	-,739	2,306
,200	105,498	,619	245,347	2,023	-,209	2,390
,250	134,623	1,743	292,884	2,129	,241	2,467
,300	167,571	4,360	348,183	2,224	,639	2,542
,350	205,259	10,004	416,500	2,312	1,000	2,620
,400	248,832	21,407	507,359	2,396	1,331	2,705
,450	299,773	42,876	640,053	2,477	1,632	2,806
,500	360,078	79,718	857,138	2,556	1,902	2,933
,550	432,514	135,296	1257,483	2,636	2,131	3,100
,600	521,059	207,194	2074,791	2,717	2,316	3,317
,650	631,668	289,109	3875,892	2,800	2,461	3,588
,700	773,738	377,609	8144,746	2,889	2,577	3,911
,750	963,102	474,849	19255,760	2,984	2,677	4,285
,800	1228,986	588,118	52309,205	3,090	2,769	4,719
,850	1632,889	731,923	172891,557	3,213	2,864	5,238
,900	2334,717	939,451	798298,203	3,368	2,973	5,902
,910	2545,298	995,134	1158277,249	3,406	2,998	6,064
,920	2795,644	1058,440	1737011,566	3,446	3,025	6,240
,930	3099,426	1131,669	2714635,896	3,491	3,054	6,434
,940	3477,885	1218,268	4474056,657	3,541	3,086	6,651
,950	3966,242	1323,735	7918529,658	3,598	3,122	6,899
,960	4628,306	1457,584	15505189,58	3,665	3,164	7,190
,970	5595,549	1638,378	35472758,32	3,748	3,214	7,550
,980	7201,228	1910,027	106796535,5	3,857	3,281	8,029
,990	10717,482	2423,989	608844884,9	4,030	3,385	8,785

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

Lampiran 4.13 IC₅₀ Fraksi Heksana**Penentuan IC₅₀ Fraksi Heksana Daun Anyang-Anyang terhadap *E. coli* menggunakan 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 ,010	2,627	,161	10,578	,419	-,795	1,024
,020	5,639	,508	18,801	,751	-,294	1,274
,030	9,155	1,054	27,102	,962	,023	1,433
,040	13,184	1,823	35,708	1,120	,261	1,553
,050	17,736	2,847	44,710	1,249	,454	1,650
,060	22,829	4,159	54,164	1,358	,619	1,734
,070	28,485	5,794	64,112	1,455	,763	1,807
,080	34,730	7,795	74,592	1,541	,892	1,873
,090	41,589	10,204	85,640	1,619	1,009	1,933
,100	49,095	13,069	97,291	1,691	1,116	1,988
,150	97,585	36,182	166,031	1,989	1,558	2,220
,200	168,459	80,189	257,356	2,226	1,904	2,411
,250	269,102	155,336	382,987	2,430	2,191	2,583
,300	409,822	271,290	567,472	2,613	2,433	2,754
,350	605,167	430,984	862,086	2,782	2,634	2,936
,400	876,001	631,574	1357,278	2,943	2,800	3,133
,450	1252,898	877,409	2193,694	3,098	2,943	3,341
,500	1781,815	1184,412	3602,396	3,251	3,074	3,557
,550	2534,017	1578,049	5993,625	3,404	3,198	3,778
,600	3624,270	2096,007	10132,179	3,559	3,321	4,006
,650	5246,264	2796,788	17519,323	3,720	3,447	4,244
,700	7746,928	3777,340	31305,726	3,889	3,577	4,496
,750	11798,005	5211,143	58721,624	4,072	3,717	4,769
,800	18846,486	7441,288	118546,913	4,275	3,872	5,074
,850	32534,442	11250,994	269345,084	4,512	4,051	5,430
,900	64667,432	18892,853	757817,177	4,811	4,276	5,880
,910	76338,622	21407,741	973128,146	4,883	4,331	5,988
,920	91416,860	24518,682	1276995,990	4,961	4,389	6,106
,930	111455,509	28461,163	1721850,243	5,047	4,454	6,236
,940	139070,206	33615,020	2404413,742	5,143	4,527	6,381
,950	179008,554	40637,137	3519209,005	5,253	4,609	6,546
,960	240816,536	50776,717	5506386,832	5,382	4,706	6,741
,970	346772,720	66761,320	9548926,083	5,540	4,825	6,980
,980	563060,575	96034,521	19855540,54	5,751	4,982	7,298
,990	1208774,369	170260,786	62973940,48	6,082	5,231	7,799

a. Logarithm base = 10.

Confidence Limits

Replikasi 2

	Probability	95% Confidence Limits for KONSENTRASI			95% Confidence Limits for log(KONSENTRASI) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	,010	3,842	,355	13,309	,585	-,449	1,124
	,020	7,832	1,007	22,943	,894	,003	1,361
	,030	12,307	1,948	32,441	1,090	,290	1,511
	,040	17,291	3,199	42,124	1,238	,505	1,625
	,050	22,799	4,786	52,123	1,358	,680	1,717
	,060	28,850	6,740	62,511	1,460	,829	1,796
	,070	35,463	9,097	73,342	1,550	,959	1,865
	,080	42,661	11,893	84,657	1,630	1,075	1,928
	,090	50,468	15,170	96,497	1,703	1,181	1,985
	,100	58,912	18,972	108,898	1,770	1,278	2,037
	,150	111,782	47,588	180,762	2,048	1,677	2,257
	,200	185,973	97,567	273,927	2,269	1,989	2,438
	,250	287,818	177,078	399,168	2,459	2,248	2,601
	,300	426,033	292,987	577,806	2,629	2,467	2,762
	,350	612,740	446,830	851,092	2,787	2,650	2,930
	,400	865,056	636,870	1287,049	2,937	2,804	3,110
	,450	1207,665	867,439	1986,548	3,082	2,938	3,298
	,500	1677,071	1151,964	3107,954	3,225	3,061	3,492
	,550	2328,929	1511,827	4920,250	3,367	3,180	3,692
	,600	3251,310	1978,553	7903,754	3,512	3,296	3,898
	,650	4590,144	2600,659	12960,603	3,662	3,415	4,113
	,700	6601,751	3457,689	21898,307	3,820	3,539	4,340
	,750	9772,047	4690,323	38663,781	3,990	3,671	4,587
	,800	15123,492	6573,207	72964,253	4,180	3,818	4,863
	,850	25161,216	9724,037	153241,641	4,401	3,988	5,185
	,900	47741,950	15887,134	390524,999	4,679	4,201	5,592
	,910	55729,646	17883,149	489633,841	4,746	4,252	5,690
	,920	65928,758	20335,157	626052,597	4,819	4,308	5,797
	,930	79310,333	23419,078	820376,469	4,899	4,370	5,914
	,940	97490,412	27416,786	1109618,992	4,989	4,438	6,045
	,950	123363,824	32812,100	1566064,797	5,091	4,516	6,195
	,960	162663,502	40517,178	2347836,878	5,211	4,608	6,371
	,970	228528,634	52503,176	3863080,365	5,359	4,720	6,587
	,980	359100,695	74079,071	7490698,605	5,555	4,870	6,875
	,990	732100,865	127396,170	21280551,07	5,865	5,105	7,328

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Probability	95% Confidence Limits for KONSENTRASI			95% Confidence Limits for log(KONSENTRASI) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ,010	3,842	,355	13,309	,585	-,449	1,124
,020	7,832	1,007	22,943	,894	,003	1,361
,030	12,307	1,948	32,441	1,090	,290	1,511
,040	17,291	3,199	42,124	1,238	,505	1,625
,050	22,799	4,786	52,123	1,358	,680	1,717
,060	28,850	6,740	62,511	1,460	,829	1,796
,070	35,463	9,097	73,342	1,550	,959	1,865
,080	42,661	11,893	84,657	1,630	1,075	1,928
,090	50,468	15,170	96,497	1,703	1,181	1,985
,100	58,912	18,972	108,898	1,770	1,278	2,037
,150	111,782	47,588	180,762	2,048	1,677	2,257
,200	185,973	97,567	273,927	2,269	1,989	2,438
,250	287,818	177,078	399,168	2,459	2,248	2,601
,300	426,033	292,987	577,806	2,629	2,467	2,762
,350	612,740	446,830	851,092	2,787	2,650	2,930
,400	865,056	636,870	1287,049	2,937	2,804	3,110
,450	1207,665	867,439	1986,548	3,082	2,938	3,298
,500	1677,071	1151,964	3107,954	3,225	3,061	3,492
,550	2328,929	1511,827	4920,250	3,367	3,180	3,692
,600	3251,310	1978,553	7903,754	3,512	3,296	3,898
,650	4590,144	2600,659	12960,603	3,662	3,415	4,113
,700	6601,751	3457,689	21898,307	3,820	3,539	4,340
,750	9772,047	4690,323	38663,781	3,990	3,671	4,587
,800	15123,492	6573,207	72964,253	4,180	3,818	4,863
,850	25161,216	9724,037	153241,641	4,401	3,988	5,185
,900	47741,950	15887,134	390524,999	4,679	4,201	5,592
,910	55729,646	17883,149	489633,841	4,746	4,252	5,690
,920	65928,758	20335,157	626052,597	4,819	4,308	5,797
,930	68130,383	21447,270	595487,895	4,833	4,331	5,775
,940	83160,414	25001,388	794030,497	4,920	4,398	5,900
,950	104389,498	29776,027	1102568,467	5,019	4,474	6,042
,960	136352,717	36558,441	1621660,606	5,135	4,563	6,210
,970	189356,248	47041,429	2606254,452	5,277	4,672	6,416
,980	292996,583	65755,485	4898167,780	5,467	4,818	6,690
,990	583000,191	111428,761	13246536,38	5,766	5,047	7,122

a. Logarithm base = 10.

Lampiran 4.14 IC₅₀ Fraksi Diklorometana
Penentuan IC₅₀ Fraksi Diklorometana Daun Anyang-Anyang terhadap *E. coli* menggunakan Analisis Probit

Replikasi 1

PROBIT	Probability	95% Confidence Limits for KONSENTRASI			95% Confidence Limits for log(KONSENTRASI) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
	,010	,856	,024	4,754	-,068	-1,621	,677
	,020	1,959	,086	8,794	,292	-1,064	,944
	,030	3,314	,194	13,001	,520	-,711	1,114
	,040	4,922	,358	17,453	,692	-,446	1,242
	,050	6,790	,588	22,185	,832	-,231	1,346
	,060	8,929	,897	27,219	,951	-,047	1,435
	,070	11,351	1,298	32,573	1,055	,113	1,513
	,080	14,073	1,807	38,265	1,148	,257	1,583
	,090	17,112	2,441	44,312	1,233	,388	1,647
	,100	20,486	3,218	50,732	1,311	,508	1,705
	,150	43,154	10,077	89,145	1,635	1,003	1,950
	,200	78,015	24,796	140,480	1,892	1,394	2,148
	,250	129,659	53,168	209,544	2,113	1,726	2,321
	,300	204,610	103,844	304,782	2,311	2,016	2,484
	,350	312,263	187,920	443,178	2,495	2,274	2,647
	,400	466,372	314,903	662,347	2,669	2,498	2,821
	,450	687,519	486,898	1041,317	2,837	2,687	3,018
	,500	1007,312	705,491	1722,547	3,003	2,848	3,236
	,550	1475,856	984,988	2957,152	3,169	2,993	3,471
	,600	2175,684	1354,352	5227,943	3,338	3,132	3,718
	,650	3249,435	1860,223	9532,548	3,512	3,270	3,979
	,700	4959,078	2580,279	18083,775	3,695	3,412	4,257
	,750	7825,764	3654,988	36267,031	3,894	3,563	4,560
	,800	13006,165	5366,568	79000,671	4,114	3,730	4,898
	,850	23513,199	8372,199	196356,273	4,371	3,923	5,293
	,900	49531,428	14609,810	619125,571	4,695	4,165	5,792
	,910	59296,983	16707,360	817293,587	4,773	4,223	5,912
	,920	72099,766	19326,573	1105200,347	4,858	4,286	6,043
	,930	89389,672	22680,205	1540292,085	4,951	4,356	6,188
	,940	113644,536	27114,568	2231853,199	5,056	4,433	6,349
	,950	149437,306	33234,737	3407386,829	5,174	4,522	6,532
	,960	206140,595	42205,050	5602541,072	5,314	4,625	6,748
	,970	306134,619	56603,865	10327088,21	5,486	4,753	7,014
	,980	517872,331	83594,962	23289917,00	5,714	4,922	7,367
	,990	1185954,267	154467,276	83960335,95	6,074	5,189	7,924

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Probability	95% Confidence Limits for KONSENTRASI			95% Confidence Limits for log(KONSENTRASI) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ,010	,285	,002	2,494	-,546	-2,723	,397
,020	,730	,009	4,907	-,136	-2,044	,691
,030	1,328	,024	7,544	,123	-1,614	,878
,040	2,081	,051	10,430	,318	-1,290	1,018
,050	3,000	,094	13,579	,477	-1,027	1,133
,060	4,096	,157	17,002	,612	-,803	1,230
,070	5,381	,247	20,711	,731	-,607	1,316
,080	6,870	,370	24,720	,837	-,432	1,393
,090	8,580	,534	29,043	,933	-,272	1,463
,100	10,528	,749	33,695	1,022	-,126	1,528
,150	24,556	3,025	62,520	1,390	,481	1,796
,200	48,139	9,119	102,787	1,683	,960	2,012
,250	85,764	23,308	158,766	1,933	1,367	2,201
,300	144,056	53,426	237,727	2,159	1,728	2,376
,350	232,938	112,499	353,968	2,367	2,051	2,549
,400	367,523	217,628	541,160	2,565	2,338	2,733
,450	571,338	379,707	885,563	2,757	2,579	2,947
,500	881,992	597,221	1581,019	2,945	2,776	3,199
,550	1361,557	879,551	3014,496	3,134	2,944	3,479
,600	2116,630	1259,354	6011,121	3,326	3,100	3,779
,650	3339,553	1792,802	12488,150	3,524	3,254	4,096
,700	5400,030	2574,998	27260,889	3,732	3,411	4,436
,750	9070,365	3781,602	63710,648	3,958	3,578	4,804
,800	16159,482	5775,015	164709,433	4,208	3,762	5,217
,850	31678,791	9425,990	500152,707	4,501	3,974	5,699
,900	73892,532	17403,322	2029854,915	4,869	4,241	6,307
,910	90665,720	20174,057	2848148,534	4,957	4,305	6,455
,920	113229,213	23683,253	4115460,472	5,054	4,374	6,614
,930	144571,378	28246,563	6169443,846	5,160	4,451	6,790
,940	189935,442	34384,974	9697960,383	5,279	4,536	6,987
,950	259288,291	43023,068	16247437,01	5,414	4,634	7,211
,960	373764,764	55972,274	29796176,19	5,573	4,748	7,474
,970	585924,646	77330,955	62812980,93	5,768	4,888	7,798
,980	1065084,007	118801,636	169334515,6	6,027	5,075	8,229
,990	2731834,168	233596,754	808778770,0	6,436	5,368	8,908

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Probability	95% Confidence Limits for KONSENTRASI			95% Confidence Limits for log(KONSENTRASI) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ,010	,277	,002	2,472	-,557	-2,767	,393
,020	,715	,008	4,880	-,146	-2,081	,688
,030	1,305	,023	7,518	,116	-1,646	,876
,040	2,052	,048	10,410	,312	-1,319	1,017
,050	2,965	,089	13,569	,472	-1,053	1,133
,060	4,056	,149	17,007	,608	-,827	1,231
,070	5,339	,235	20,737	,727	-,628	1,317
,080	6,827	,354	24,772	,834	-,451	1,394
,090	8,539	,513	29,126	,931	-,290	1,464
,100	10,491	,722	33,814	1,021	-,141	1,529
,150	24,608	2,963	62,929	1,391	,472	1,799
,200	48,455	9,041	103,715	1,685	,956	2,016
,250	86,653	23,347	160,577	1,938	1,368	2,206
,300	146,047	53,984	241,054	2,164	1,732	2,382
,350	236,902	114,479	360,140	2,375	2,059	2,556
,400	374,897	222,439	553,629	2,574	2,347	2,743
,450	584,492	388,422	913,937	2,767	2,589	2,961
,500	904,872	610,424	1648,504	2,957	2,786	3,217
,550	1400,864	898,813	3173,613	3,146	2,954	3,502
,600	2184,050	1287,661	6385,775	3,339	3,110	3,805
,650	3456,253	1834,969	13384,965	3,539	3,264	4,127
,700	5606,385	2639,002	29486,820	3,749	3,421	4,470
,750	9449,079	3881,563	69586,733	3,975	3,589	4,843
,800	16898,106	5938,307	181846,264	4,228	3,774	5,260
,850	33273,434	9713,332	559126,052	4,522	3,987	5,748
,900	78044,697	17983,097	2305018,567	4,892	4,255	6,363
,910	95889,041	20860,040	3246483,133	4,982	4,319	6,511
,920	119927,205	24506,337	4710328,325	5,079	4,389	6,673
,930	153369,132	29251,611	7093128,304	5,186	4,466	6,851
,940	201854,966	35640,288	11206230,10	5,305	4,552	7,049
,950	276123,522	44639,304	18882434,22	5,441	4,650	7,276
,960	398989,118	58144,798	34862860,52	5,601	4,765	7,542
,970	627315,049	80451,424	74105814,86	5,797	4,906	7,870
,980	1144803,628	123839,151	201991602,6	6,059	5,093	8,305
,990	2954513,029	244259,879	981651474,4	6,470	5,388	8,992

a. Logarithm base = 10.

Lampiran 4.15 IC₅₀ Fraksi Etil AsetatPenentuan IC₅₀ Fraksi Etil Asetat Daun Anyang-Anyang terhadap *E. coli* menggunakan 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 ,010	,524	,007	3,698	-,281	-2,179	,568
,020	1,291	,029	7,119	,111	-1,543	,852
,030	2,287	,072	10,794	,359	-1,141	1,033
,040	3,518	,145	14,770	,546	-,838	1,169
,050	4,994	,256	19,068	,698	-,592	1,280
,060	6,727	,415	23,707	,828	-,382	1,375
,070	8,737	,633	28,702	,941	-,199	1,458
,080	11,040	,924	34,071	1,043	-,035	1,532
,090	13,658	1,302	39,832	1,135	,115	1,600
,100	16,614	1,786	46,005	1,220	,252	1,663
,150	37,386	6,581	83,857	1,573	,818	1,924
,200	71,228	18,413	136,169	1,853	1,265	2,134
,250	123,827	44,014	208,736	2,093	1,644	2,320
,300	203,466	94,441	312,246	2,308	1,975	2,494
,350	322,367	184,905	469,923	2,508	2,267	2,672
,400	498,879	328,015	738,616	2,698	2,516	2,868
,450	761,166	524,019	1246,909	2,881	2,719	3,096
,500	1153,597	774,485	2239,782	3,062	2,889	3,350
,550	1748,353	1099,955	4186,792	3,243	3,041	3,622
,600	2667,553	1538,981	8070,338	3,426	3,187	3,907
,650	4128,177	2153,011	16084,804	3,616	3,333	4,206
,700	6540,573	3045,763	33503,032	3,816	3,484	4,525
,750	10747,154	4407,977	74303,445	4,031	3,644	4,871
,800	18683,609	6629,859	181017,329	4,271	3,822	5,258
,850	35596,320	10638,693	512529,983	4,551	4,027	5,710
,900	80101,196	19237,239	1903719,229	4,904	4,284	6,280
,910	97434,814	22189,245	2614460,065	4,989	4,346	6,417
,920	120541,549	25908,985	3690683,384	5,081	4,413	6,567
,930	152321,208	30719,161	5392459,394	5,183	4,487	6,732
,940	197814,456	37149,724	8236886,045	5,296	4,570	6,916
,950	266503,362	46135,880	13355189,38	5,426	4,664	7,126
,960	378253,988	59498,018	23567430,71	5,578	4,775	7,372
,970	581764,954	81322,957	47385170,65	5,765	4,910	7,676
,980	1031059,367	123165,675	119948347,6	6,013	5,090	8,079
,990	2541015,732	236809,260	518747235,7	6,405	5,374	8,715

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Probability	95% Confidence Limits for KONSENTRASI			95% Confidence Limits for log(KONSENTRASI) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ,010	,617	,011	3,946	-,210	-1,951	,596
,020	1,470	,044	7,461	,167	-1,354	,873
,030	2,550	,106	11,185	,407	-,975	1,049
,040	3,860	,204	15,174	,587	-,690	1,181
,050	5,407	,348	19,454	,733	-,459	1,289
,060	7,203	,547	24,042	,858	-,262	1,381
,070	9,263	,814	28,955	,967	-,089	1,462
,080	11,603	1,162	34,209	1,065	,065	1,534
,090	14,241	1,604	39,821	1,154	,205	1,600
,100	17,196	2,159	45,809	1,235	,334	1,661
,150	37,537	7,360	82,100	1,574	,867	1,914
,200	69,807	19,373	131,430	1,844	1,287	2,119
,250	118,868	44,008	198,729	2,075	1,644	2,298
,300	191,714	90,491	292,718	2,283	1,957	2,466
,350	298,550	171,504	431,259	2,475	2,234	2,635
,400	454,518	298,891	655,645	2,658	2,476	2,817
,450	682,581	475,488	1057,949	2,834	2,677	3,024
,500	1018,493	701,874	1812,492	3,008	2,846	3,258
,550	1519,714	993,321	3238,747	3,182	2,997	3,510
,600	2282,263	1381,985	5975,655	3,358	3,141	3,776
,650	3474,558	1919,857	11396,991	3,541	3,283	4,057
,700	5410,818	2694,080	22678,098	3,733	3,430	4,356
,750	8726,762	3863,563	47894,743	3,941	3,587	4,680
,800	14859,860	5750,678	110525,172	4,172	3,760	5,043
,850	27635,145	9114,506	293838,785	4,441	3,960	5,468
,900	60323,657	16224,141	1008435,242	4,780	4,210	6,004
,910	72840,462	18642,567	1358748,211	4,862	4,271	6,133
,920	89398,382	21677,665	1878720,130	4,951	4,336	6,274
,930	111980,553	25585,195	2683160,782	5,049	4,408	6,429
,940	144007,248	30783,509	3995522,872	5,158	4,488	6,602
,950	191855,888	38007,594	6293055,132	5,283	4,580	6,799
,960	268752,965	48680,780	10733080,91	5,429	4,687	7,031
,970	406730,342	65978,947	20694944,63	5,609	4,819	7,316
,980	705542,436	98811,652	49549567,26	5,849	4,995	7,695
,990	1680962,636	186649,906	196292822,8	6,226	5,271	8,293

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	,010	,505	,006	3,570	-,297	-2,188	,553
	,020	1,239	,028	6,859	,093	-1,557	,836
	,030	2,191	,070	10,387	,341	-1,157	1,017
	,040	3,363	,139	14,200	,527	-,857	1,152
	,050	4,766	,244	18,318	,678	-,612	1,263
	,060	6,413	,394	22,759	,807	-,405	1,357
	,070	8,320	,599	27,538	,920	-,222	1,440
	,080	10,503	,872	32,671	1,021	-,059	1,514
	,090	12,982	1,226	38,176	1,113	,089	1,582
	,100	15,778	1,678	44,070	1,198	,225	1,644
	,150	35,382	6,127	80,151	1,549	,787	1,904
	,200	67,227	17,028	129,854	1,828	1,231	2,113
	,250	116,600	40,501	198,489	2,067	1,607	2,298
	,300	191,188	86,674	295,620	2,281	1,938	2,471
	,350	302,325	169,924	441,437	2,480	2,230	2,645
	,400	466,999	303,625	684,614	2,669	2,482	2,835
	,450	711,252	489,972	1137,344	2,852	2,690	3,056
	,500	1076,054	729,193	2017,021	3,032	2,863	3,305
	,550	1627,964	1039,032	3736,057	3,212	3,017	3,572
	,600	2479,433	1455,616	7149,495	3,394	3,163	3,854
	,650	3829,967	2037,009	14157,615	3,583	3,309	4,151
	,700	6056,292	2881,033	29304,396	3,782	3,460	4,467
	,750	9930,514	4167,291	64573,144	3,997	3,620	4,810
	,800	17223,550	6262,791	156215,872	4,236	3,797	5,194
	,850	32725,200	10038,807	438777,056	4,515	4,002	5,642
	,900	73388,090	18125,787	1613604,217	4,866	4,258	6,208
	,910	89195,043	20899,564	2210727,066	4,950	4,320	6,345
	,920	110248,376	24393,287	3112651,858	5,042	4,387	6,493
	,930	139176,449	28909,161	4534928,580	5,144	4,461	6,657
	,940	180544,013	34943,277	6904992,306	5,257	4,543	6,839
	,950	242929,336	43370,690	11155118,40	5,385	4,637	7,047
	,960	344284,283	55893,805	19601385,68	5,537	4,747	7,292
	,970	528554,806	76332,175	39205366,49	5,723	4,883	7,593
	,980	934489,372	115476,490	98555517,90	5,971	5,062	7,994
	,990	2294247,766	221627,773	421593017,2	6,361	5,346	8,625

a. Logarithm base = 10.

Lampiran 4.16 IC₅₀ Residu**Penentuan IC₅₀ Residu Daun Anyang-Anyang terhadap *E. coli* menggunakan Analisis Probit**

Replikasi 1

Confidence Limits

PROBIT	Probability	95% Confidence Limits for KONSENTRASI			95% Confidence Limits for log(KONSENTRASI) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
	,010	,251	,001	2,573	-,600	-3,110	,410
	,020	,687	,005	5,227	-,163	-2,346	,718
	,030	1,302	,014	8,201	,115	-1,862	,914
	,040	2,106	,032	11,514	,323	-1,498	1,061
	,050	3,113	,063	15,180	,493	-1,202	1,181
	,060	4,343	,112	19,213	,638	-,950	1,284
	,070	5,814	,186	23,629	,764	-,729	1,373
	,080	7,550	,294	28,447	,878	-,532	1,454
	,090	9,576	,444	33,685	,981	-,353	1,527
	,100	11,917	,649	39,367	1,076	-,187	1,595
	,150	29,476	3,120	75,380	1,469	,494	1,877
	,200	60,541	10,767	127,402	1,782	1,032	2,105
	,250	112,260	30,757	202,497	2,050	1,488	2,306
	,300	195,456	77,090	314,375	2,291	1,887	2,497
	,350	326,747	172,072	496,056	2,514	2,236	2,696
	,400	532,071	334,977	841,556	2,726	2,525	2,925
	,450	852,802	562,256	1592,808	2,931	2,750	3,202
	,500	1356,684	855,237	3266,266	3,132	2,932	3,514
	,550	2158,286	1244,719	7000,145	3,334	3,095	3,845
	,600	3459,295	1784,594	15510,955	3,539	3,252	4,191
	,650	5633,080	2560,892	35697,943	3,751	3,408	4,553
	,700	9416,886	3721,862	86510,853	3,974	3,571	4,937
	,750	16395,833	5546,493	225887,333	4,215	3,744	5,354
	,800	30402,191	8619,734	659929,947	4,483	3,935	5,819
	,850	62444,098	14370,876	2308963,548	4,795	4,157	6,363
	,900	154453,088	27268,895	11192335,42	5,189	4,436	7,049
	,910	192216,968	31821,928	16391610,10	5,284	4,503	7,215
	,920	243776,043	37629,785	24812945,43	5,387	4,576	7,395
	,930	316565,939	45241,467	39147915,67	5,500	4,656	7,593
	,940	423834,134	55569,539	65152391,69	5,627	4,745	7,814
	,950	591199,628	70246,457	116491576,8	5,772	4,847	8,066
	,960	874073,513	92499,969	230600439,1	5,942	4,966	8,363
	,970	1413554,150	129713,297	533996106,8	6,150	5,113	8,728
	,980	2678110,349	203264,861	1630940671	6,428	5,308	9,212
	,990	7332094,606	412386,883	9482545403	6,865	5,615	9,977

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 ,010	,160	,000	1,949	-,796	-3,567	,290
,020	,452	,002	4,025	-,345	-2,764	,605
,030	,873	,006	6,381	-,059	-2,255	,805
,040	1,433	,013	9,028	,156	-1,872	,956
,050	2,145	,028	11,976	,331	-1,561	1,078
,060	3,023	,051	15,238	,480	-1,296	1,183
,070	4,085	,086	18,826	,611	-1,064	1,275
,080	5,348	,139	22,757	,728	-,856	1,357
,090	6,832	,215	27,046	,835	-,667	1,432
,100	8,561	,321	31,714	,933	-,494	1,501
,150	21,779	1,673	61,532	1,338	,223	1,789
,200	45,746	6,171	104,946	1,660	,790	2,021
,250	86,469	18,713	167,676	1,937	1,272	2,224
,300	153,170	49,762	260,104	2,185	1,697	2,415
,350	260,180	118,765	405,183	2,415	2,075	2,608
,400	430,146	250,905	666,779	2,634	2,400	2,824
,450	699,624	454,092	1230,038	2,845	2,657	3,090
,500	1129,184	721,752	2534,808	3,053	2,858	3,404
,550	1822,487	1075,382	5572,387	3,261	3,032	3,746
,600	2964,242	1565,254	12781,769	3,472	3,195	4,107
,650	4900,680	2272,867	30602,332	3,690	3,357	4,486
,700	8324,470	3338,596	77456,586	3,920	3,524	4,889
,750	14745,891	5027,743	212170,823	4,169	3,701	5,327
,800	27872,818	7900,391	654226,053	4,445	3,898	5,816
,850	58544,607	13336,714	2438647,760	4,767	4,125	6,387
,900	148943,468	25697,825	12805643,23	5,173	4,410	7,107
,910	186625,227	30098,864	19120962,25	5,271	4,479	7,282
,920	238439,670	35734,137	29560009,59	5,377	4,553	7,471
,930	312161,967	43150,271	47729559,83	5,494	4,635	7,679
,940	421747,298	53259,306	81515677,83	5,625	4,726	7,911
,950	594408,179	67699,655	150113829,2	5,774	4,831	8,176
,960	889567,168	89726,634	307644110,3	5,949	4,953	8,488
,970	1460274,570	126829,837	743448115,3	6,164	5,103	8,871
,980	2822146,631	200856,480	2403169318	6,451	5,303	9,381
,990	7972225,850	414326,309	1,528E+10	6,902	5,617	10,184

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Probability	95% Confidence Limits for KONSENTRASI			95% Confidence Limits for log(KONSENTRASI) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ,010	,188	,000	2,117	-,727	-3,364	,326
,020	,520	,003	4,332	-,284	-2,586	,637
,030	,993	,008	6,828	-,003	-2,092	,834
,040	1,616	,019	9,618	,209	-1,721	,983
,050	2,402	,038	12,714	,381	-1,419	1,104
,060	3,364	,069	16,128	,527	-1,163	1,208
,070	4,521	,115	19,874	,655	-,938	1,298
,080	5,891	,183	23,966	,770	-,737	1,380
,090	7,494	,279	28,423	,875	-,554	1,454
,100	9,352	,412	33,263	,971	-,385	1,522
,150	23,401	2,041	64,014	1,369	,310	1,806
,200	48,510	7,229	108,482	1,686	,859	2,035
,250	90,663	21,172	172,388	1,957	1,326	2,237
,300	158,979	54,562	266,140	2,201	1,737	2,425
,350	267,520	126,495	412,723	2,427	2,102	2,616
,400	438,354	260,411	675,166	2,642	2,416	2,829
,450	706,847	462,670	1230,273	2,849	2,665	3,090
,500	1131,192	727,937	2484,812	3,054	2,862	3,395
,550	1810,285	1077,738	5333,215	3,258	3,033	3,727
,600	2919,092	1560,649	11923,409	3,465	3,193	4,076
,650	4783,173	2255,274	27787,040	3,680	3,353	4,444
,700	8048,845	3296,640	68344,377	3,906	3,518	4,835
,750	14113,732	4939,021	181491,517	4,150	3,694	5,259
,800	26378,211	7716,998	540590,919	4,421	3,887	5,733
,850	54680,487	12941,623	1935325,569	4,738	4,112	6,287
,900	136826,794	24731,505	9658940,112	5,136	4,393	6,985
,910	170758,385	28909,424	14246374,45	5,232	4,461	7,154
,920	217221,145	34247,863	21732251,47	5,337	4,535	7,337
,930	283026,764	41257,362	34579274,72	5,452	4,616	7,539
,940	380348,039	50787,979	58096906,75	5,580	4,706	7,764
,950	532806,142	64363,239	105006370,7	5,727	4,809	8,021
,960	791692,136	85002,068	210526491,0	5,899	4,929	8,323
,970	1288227,654	119627,981	495203826,5	6,110	5,078	8,695
,980	2460709,374	188354,695	1544297246	6,391	5,275	9,189
,990	6824295,375	385000,458	9278769658	6,834	5,585	9,967

a. Logarithm base = 10.