



**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN
WARU GUNUNG (*Hibiscus macrophyllus*) DAN FRAKSINYA
TERHADAP *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Oleh:

Afif Rifqie Maulana

142210101032

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2020



**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN
WARU GUNUNG (*Hibiscus macrophyllus*) DAN FRAKSINYA
TERHADAP *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

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

Oleh:

Afif Rifqie Maulana

142210101032

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan sebagai bentuk tanggung jawab, bukti, dan ungkapan terimakasih kepada:

1. Tuhan Yang Maha Esa yang selalu memberikan berkat dan rahmatnya kepada penulis;
2. Ayahanda Sugianto dan Supiyati tercinta, dua insan yang senantiasa memberikan kasih sayang sepanjang masa, dukungan moril dan materil, semangat, motivasi, dan nasihat serta doa-doa yang tak pernah putus kepada penulis untuk senantiasa menjadi lebih baik.
3. Guru-guru penulis TK Al-Amien Prenduan, SDN 1 Aengdake, MTsN Sumenep, SMA Negeri 1 Pamekasan, guru spiritual, laboran, serta seluruh dosen pengajar Fakultas Farmasi Universitas Jember.
4. Teman-teman Farmasi Universitas Jember tahun angkatan 2014 “Pharmagen” dan tahun angkatan 2015 “Libitum”.
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

“Yakinlah, Dibalik Kesulitan ada Kemudahan Yang Dekat.”

(Syaikh Abdurrahman bin Nashir As Sa’di)

“Yakinlah, Badai Pasti Berlalu”

"Berpikirlah positif, tidak peduli seberapa keras kehidupanmu."

(Sahabat Ali bin Abi Thalib)

"Hidup itu bukan soal menemukan diri Anda sendiri, hidup itu membuat diri Anda sendiri."

(George Bernard Shaw)

“Beri aku Seribu orang tua niscaya akan kucabut semeru dari akarnya. Beri aku sepuluh pemuda niscaya akan kugoncangkan dunia.”

(Presiden RI ke 1 Ir. Soekarno)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Afif Rifqie Maulana

NIM : 142210101032

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Waru Gunung (*Hibiscus macrophyllus*) dan Fraksinya terhadap *Staphylococcus aureus*” 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 dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 21 Januari 2020

Yang menyatakan,



Afif Rifqie Maulana

NIM. 142210101032

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN WARU
GUNUNG (*Hibiscus macrophyllus*) DAN FRAKSINYA TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

Oleh:

Afif Rifqie Maulana

NIM 142210101032

Pembimbing :

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

Dosen Pembimbing Anggota : Moch. Amrun Hidayat, S.Si., Apt., M.Farm.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Waru Gunung (*Hibiscus macrophyllus*) dan Fraksinya terhadap *Staphylococcus aureus*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

Hari, tanggal : Selasa, 21 Januari 2020

Tempat : Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,



Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP. 198201292009121003

Dosen Pembimbing Anggota,



Moch. Amrun Hidayat, S.Si., Apt., M.Farm.
NIP. 197801262001121004

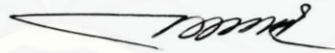
Tim Penguji

Dosen Penguji I,



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

Dosen Penguji II,



Nuri, S.Si., Apt., M. Si.
NIP. 196904122001121007

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember



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

RINGKASAN

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Waru Gunung (*Hibiscus macrophyllus*) dan Fraksinya terhadap *Staphylococcus aureus*; Afif Rifqie Maulana; 142210101032; 2020; 65 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Infeksi merupakan salah satu penyebab utama masalah kesehatan dunia terutama di negara berkembang seperti Indonesia, salah satunya adalah infeksi saluran pernapasan akut (ISPA). ISPA merupakan infeksi akut yang menyerang saluran pernapasan mulai dari hidung sampai alveoli. Infeksi ini dapat disebabkan oleh bakteri seperti *Staphylococcus aureus*. Hasil Riset kesehatan dasar 2018 melaporkan ISPA menyumbang prevalensi sebesar 4,4% dengan jumlah 168.406 kasus di Indonesia. Tingginya angka tersebut maka dianggap perlu dilakukan intervensi untuk mengatasinya. Terapi yang digunakan untuk pengobatan infeksi saat ini dengan pemberian antibiotik. Namun banyak kasus resistensi bakteri terhadap antibiotik sehingga perlu dikembangkannya alternatif yang bersumber dari tumbuhan. Salah satu tumbuhan yang memiliki aktivitas antibakteri adalah Waru Gunung (*Hibiscus macrophyllus*), sehingga pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun Waru Gunung (*H. macrophyllus*) dan fraksinya terhadap *Staphylococcus aureus*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* dan fraksinya memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Metode yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri ini adalah metode difusi cakram dengan mengamati adanya zona bening atau zona hambat yang terbentuk disekitar cakram yang berisi sampel uji. Sampel uji yang digunakan adalah ekstrak etanol 96% dan fraksinya (fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air) daun *H. macrophyllus* dengan masing-masing konsentrasi uji 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%. Fraksi n-heksana menarik senyawa nonpolar, fraksi etil asetat menarik senyawa semipolar, dan fraksi air menarik senyawa polar dari ekstrak etanol daun *H. macrophyllus*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua sampel uji memiliki aktivitas antibakteri kecuali pada fraksi air. Aktivitas antibakteri tertinggi didapat pada fraksi etil asetat yang menarik senyawa semipolar pada ekstrak etanol daun *H. macrophyllus*. Aktivitas antibakteri sampel uji secara berurutan dari tinggi ke rendah antara lain fraksi etil asetat, ekstrak etanol, fraksi n-heksana, dan fraksi air. Pada fraksi etil asetat didapatkan hasil diameter zona hambat pada konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% secara berturut-turut adalah 8,28 mm; 9,47 mm; 10,40 mm; 10,71 mm; dan 12,04 mm. Pada ekstrak etanol adalah 8,25 mm; 8,97 mm; 9,60 mm; 10,04 mm; dan 11,58 mm. Pada fraksi n-heksana adalah 7,59 mm; 8,24 mm; 9,18 mm; 9,64 mm; dan 10,31 mm. Dan pada fraksi air tidak didapatkan hasil diameter zona hambat. Selanjutnya data hasil pengukuran dianalisis statistika untuk uji normalitas dan homogenitas. Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai $p > 0,05$ yang artinya ekstrak etanol dan fraksinya terdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya uji LSD *post hoc* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan atau tidak antar konsentrasi dan antar sampel. Hasil uji LSD *post hoc* antar konsentrasi menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada sampel ekstrak dan beberapa tidak berbeda signifikan pada sampel fraksi kecuali fraksi air. Sedangkan pada uji LSD antar sampel menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan pada konsentrasi 15% dan 20% dan beberapa yang berbeda signifikan pada konsentrasi 5%, 10%, dan 25% antar sampel ekstrak dan fraksi kecuali fraksi air tidak dapat dianalisis.

PRAKATA

Alhamdulillah ‘ala kulli haal, puja dan puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Subhanahu Wa Ta’ala, dengan Rahmat Ridho dan Hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Waru Gunung (*Hibiscus macrophyllus*) dan Fraksinya terhadap *Staphylococcus aureus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi syarat penyelesaian pendidikan Strata Satu (S1) di Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada kedua Orang tua, ayahanda Sugianto dan Ibunda Supiyati yang selalu memberikan dukungan penuh, doa dan motivasi. Penyusunan skripsi ini juga tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M. Farm., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing utama dan Bapak Moch. Amrun Hidayat, S.Si., Apt., M.Farm. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, perhatian, dan tenaga dalam membimbing penulis menyelesaikan penelitian ini;
1. Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M. Farm., Apt. dan Bapak Nuri, S.Si., Apt., M. Si. selaku dosen penguji yang banyak memberikan saran yang bermanfaat dalam penulisan skripsi ini;
2. Ibu Widi dan Mbak Parka selaku teknisi Laboratorium Farmasi Universitas Jember yang telah membantu dalam penelitian;
3. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan berbagai pengalaman; staff dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi;
4. Teman Teman Seperjuangan Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember “Robby, Alwi, Zidni, Wayan, Meranti, Icha, Tyas, Tahir” dan teman-teman seperjuangan diluar laboratorium biologi “Ifan,

Sidqi, Fajar, Alfi” yang sangat membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;

5. Teman-teman laki-laki Farmasi angkatan 2014 “Alfi, Huda, Fajar, Rafli, Rizki, Dani, Agus, Joppy, Samsyu, Resa, Mijil”;
6. Seluruh teman-teman Farmasi tahun angkatan 2014 “Pharmagen” dan 2015 “Libitum”;
7. Seluruh pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu.

Hanya doa dan ucapan terimakasih yang dapat penulis sampaikan atas segala bentuk dukungan yang telah diberikan semoga mendapat balasan dari Allah Subhanahu Wa Ta’ala. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca serta tidak menutup adanya saran dan kritikan demi penyempurnaan penulisan skripsi ini.

Jember, 21 Januari 2020

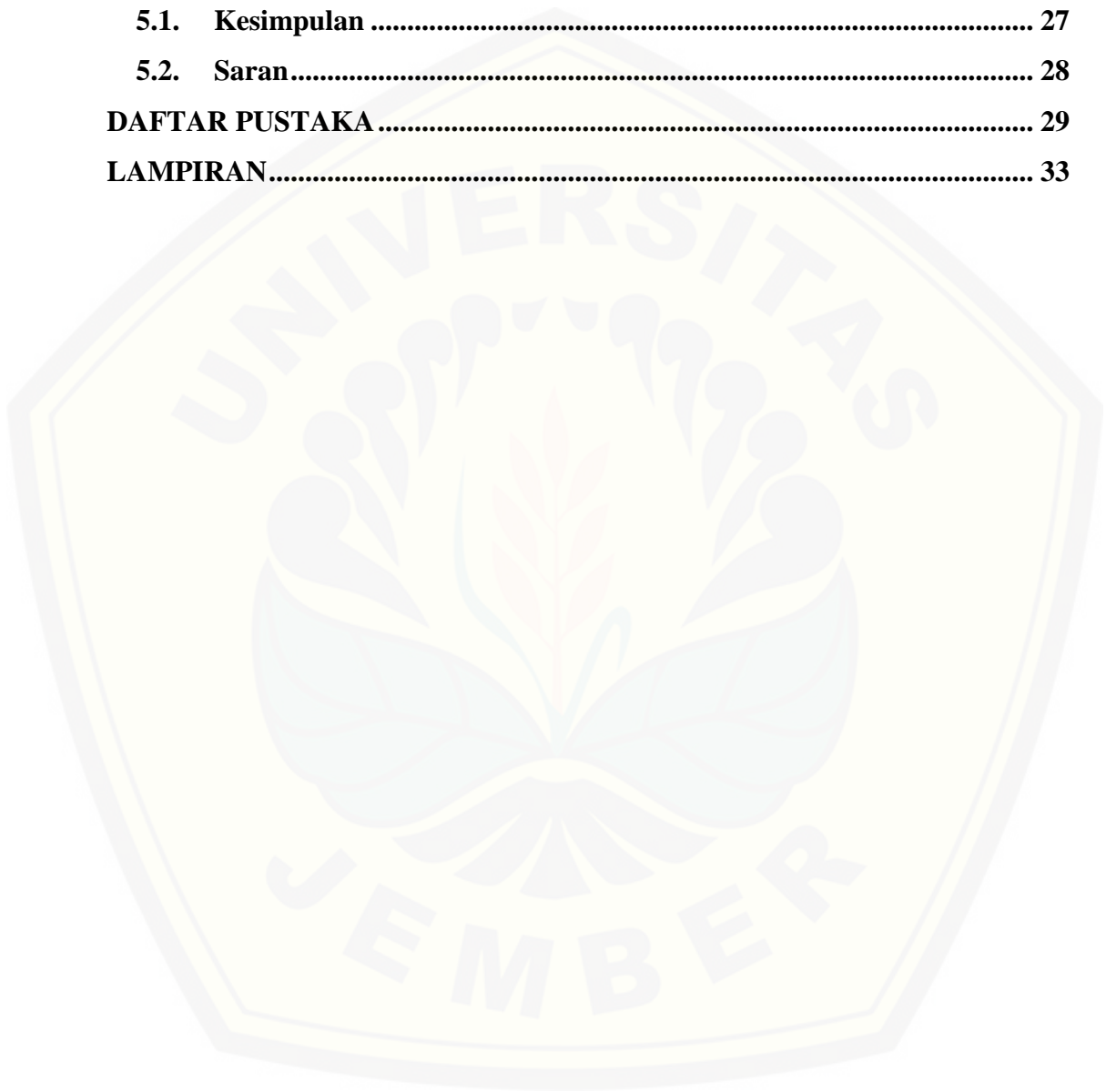
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN.....	v
HALAMAN BIMBINGAN.....	vi
PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
RINGKASAN	vii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR RUMUS	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tinjauan <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.1.1 Sistem klasifikasi	4
2.1.2 Morfologi dan Patogenesis	4
2.2 Tinjauan <i>Hibiscus macrophyllus</i>	6
2.2.1. Klasifikasi <i>H. macrophyllus</i>	6
2.2.2. Nama Lokal dan Sebaran Tumbuh	6
2.2.3. Morfologi <i>H. macrophyllus</i>	7
2.3. Metode Ekstraksi.....	7
2.4. Metode Fraksinasi	8

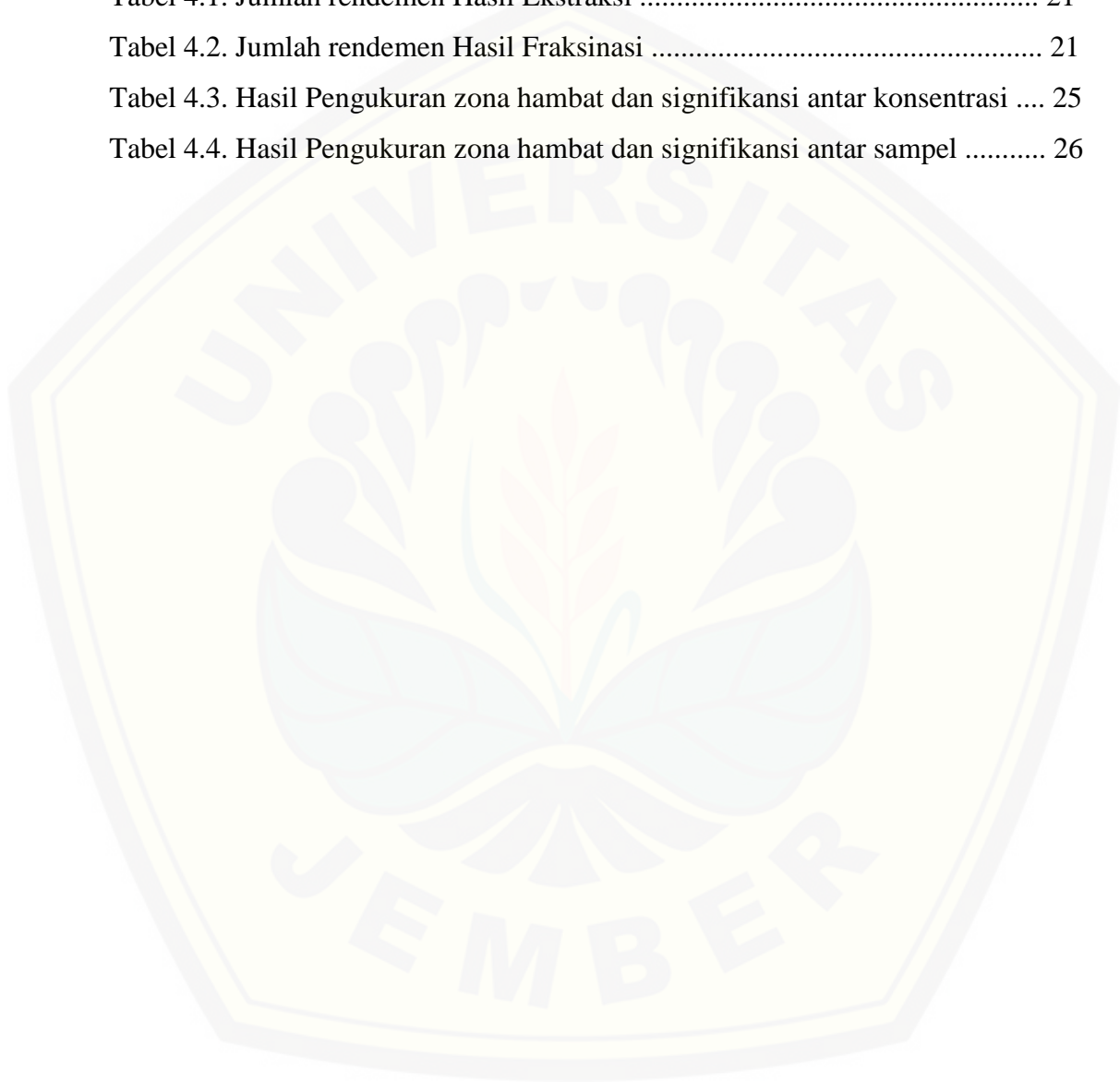
2.5. Metode Pengujian Antibakteri.....	9
2.6. Antibiotik Gentamisin.....	10
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	11
3.1. Jenis Penelitian	11
3.2. Rancangan Penelitian.....	11
3.3. Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.4. Alat dan Bahan Penelitian	11
3.4.1. Alat.....	11
3.4.2. Bahan	11
3.5. Variabel Penelitian dan Variabel Operasional.....	11
3.5.1. Variabel Bebas	11
3.5.2. Variabel Terikat	12
3.5.3. Variabel Terkendali	12
3.6. Definisi operasional	12
3.7. Rancangan Penelitian.....	12
3.7.1. Rancangan Percobaan	12
3.8. Prosedur Penelitian	14
3.8.1. Pengumpulan Sampel dan Determinasi Tanaman	14
3.8.2. Pembuatan Simplisia dan Serbuk Daun.....	14
3.8.3. Proses Ekstraksi	14
3.8.4. Metode Fraksinasi.....	14
3.8.5. Sterilisasi Alat dan Bahan.....	15
3.8.6. Pembuatan Media	16
3.8.7. Peremajaan Biakan Bakteri.....	16
3.8.8. Pembuatan Suspensi Bakteri.....	16
3.8.9. Pembuatan larutan uji antibakteri	17
3.8.10. Kontrol positif dan kontrol negatif	17
3.8.11. Uji aktivitas antibakteri metode difusi cakram	17
3.8.12. Analisis Data.....	18
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1. Determinasi Tumbuhan Waru Gunung.....	19

4.2. Ekstraksi Daun Waru Gunung	19
4.3. Fraksinasi Daun Waru Gunung.....	19
4.4. Pengujian antibakteri.....	20
BAB 5. PENUTUP.....	27
5.1. Kesimpulan	27
5.2. Saran.....	28
DAFTAR PUSTAKA	29
LAMPIRAN.....	33



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1. Klasifikasi respon kemampuan hambat bakteri	20
Tabel 4.1. Jumlah rendemen Hasil Ekstraksi	21
Tabel 4.2. Jumlah rendemen Hasil Fraksinasi	21
Tabel 4.3. Hasil Pengukuran zona hambat dan signifikansi antar konsentrasi	25
Tabel 4.4. Hasil Pengukuran zona hambat dan signifikansi antar sampel	26

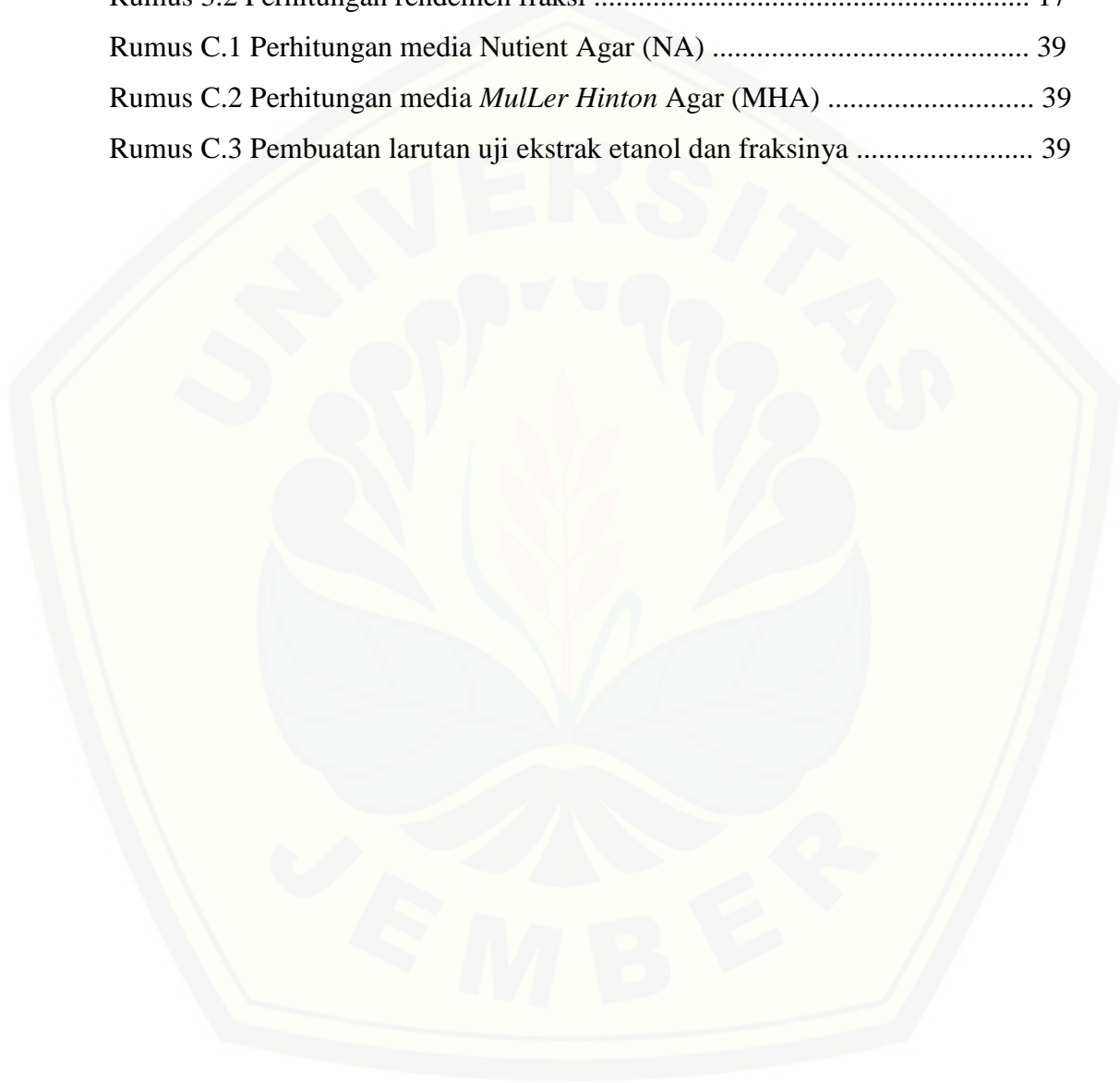


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Morfologi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	4
Gambar 2.2. Pohon dan daun <i>Hibiscus macrophyllus</i>	6
Gambar 3.1. Skema rancangan penelitian aktivitas antibakteri.....	11
Gambar 3.2. Skema Alur Penelitian.....	15
Gambar 3.3. Skema Fraksinasi.....	17
Gambar 4.1. Hasil pengamatan uji antibakteri ekstrak etanol 96%.....	22
Gambar 4.2. Hasil pengamatan uji antibakteri fraksi n-heksana.....	23
Gambar 4.3. Hasil pengamatan uji antibakteri fraksi etil asetat.....	23
Gambar 4.4. Hasil pengamatan uji antibakteri fraksi air.....	24

DAFTAR RUMUS

	Halaman
Rumus 3.1 Perhitungan rendemen ekstrak	16
Rumus 3.2 Perhitungan rendemen fraksi	17
Rumus C.1 Perhitungan media Nutient Agar (NA)	39
Rumus C.2 Perhitungan media <i>Muller Hinton</i> Agar (MHA)	39
Rumus C.3 Pembuatan larutan uji ekstrak etanol dan fraksinya	39



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman	36
B. Hasil rendemen ekstrak etanol daun waru gunung dan fraksinya	37
C. Perhitungan pembuatan media agar uji dan larutan uji	39
D. Hasil uji aktivitas antibakteri semua sampel uji	41
D1. Gambar Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol	41
D2. Gambar Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksana	42
D3. Gambar Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat	43
D4. Gambar Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air	44
D1. Tabel pengukuran diameter zona hambat semua sampel uji	45
D2. Tabel pengukuran diameter zona hambat ekstrak	46
D3. Tabel pengukuran diameter zona hambat fraksi n-heksana	46
D4. Tabel pengukuran diameter zona hambat fraksi etil asetat	47
D5. Tabel pengukuran diameter zona hambat fraksi air	47
E. Analisis data statistik	48

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi merupakan salah satu penyebab utama masalah kesehatan dunia terutama di negara berkembang seperti Indonesia (Departemen Kesehatan RI, 2008). Infeksi menyumbang sebesar 22% penyebab kematian di dunia pada abad ke 21 ini (Mardiastuti dkk, 2007). *World Health Organization* (WHO) melaporkan bahwa infeksi merupakan satu dari sepuluh besar penyakit yang terjadi di Indonesia, diantaranya adalah infeksi saluran pernapasan dengan prevalensi sebesar 5,2% (WHO, 2015). Contoh dari infeksi saluran pernapasan adalah ISPA (infeksi saluran pernapasan akut). ISPA merupakan infeksi akut yang menyerang saluran pernapasan mulai dari hidung sampai alveoli. Infeksi ini dapat disebabkan oleh bakteri seperti *Staphylococcus aureus* (WHO, 2007). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Petegrew (2008) *S. aureus* merupakan satu dari empat besar penyebab ISPA selain *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, dan *M. Catarrhalis*. Hasil Riset kesehatan dasar 2018 melaporkan ISPA menyumbang prevalensi sebesar 4,4% dengan jumlah 168.406 kasus di Indonesia (Kemenkes RI, 2018). Tingginya angka tersebut maka dianggap perlu dilakukan intervensi untuk mengatasinya.

Terapi yang digunakan untuk pengobatan infeksi saat ini yaitu dengan pemberian antibiotik. Namun banyak kasus resistensi bakteri terhadap antibiotik diakibatkan penggunaan antibiotik yang tidak rasional (Kuswandi, 2011), serta timbulnya efek samping antibiotik seperti reaksi alergi, penekanan sistem imun, dan hipersensitivitas (Bibi dkk., 2004). Resistensi bakteri terhadap antibiotik menjadi perhatian dunia saat ini. Adanya resistensi dan timbulnya efek samping antibiotik menunjukkan bahwa perlu dikembangkannya alternatif pengganti antibiotik yang bersumber dari tumbuhan. Pengobatan yang berasal dari tumbuhan memiliki beberapa keuntungan seperti pengobatan yang murah namun efek samping yang lebih kecil dan mudah diterima pasien. (Tavish dkk., 2002)

Senyawa aktif pada tumbuhan memiliki aktivitas antibakteri yang telah dibuktikan oleh beberapa penelitian sebelumnya. Salah satu tumbuhan yang

memiliki senyawa aktif yang dapat menghambat bakteri adalah tumbuhan genus *Hibiscus*. Beberapa penelitian yang melaporkan adanya aktivitas antibakteri pada tumbuhan ini antara lain ekstrak etanol daun *Hibiscus tiliaceus* menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella paratyphi* (Ramproshad dkk., 2012). Ekstrak etanol daun dan bunga *Hibiscus rosasinensis* menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhirium* (Uddin dkk., 2010). Ekstrak metanol daun dan buah *Hibiscus sabdariffa* menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa* (Sekar dkk., 2015).

Salah satu tumbuhan genus *Hibiscus* lain yang banyak tersebar di Indonesia adalah waru gunung (*Hibiscus macrophyllus*). Tumbuhan ini banyak tersebar di daerah Jawa, Sumatera, Kalimantan Timur dan Kalimantan Selatan. (Satrapradja dkk. 1980. Ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* dilaporkan memiliki kandungan metabolit sekunder antara lain senyawa flavonoid, alkaloid, polifenol, saponin, steroid, triterpenoid dan tannin yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Bacillus cereus* (Agustina, 2017). Namun belum diketahui golongan senyawa berdasarkan kepolarannya yang berpotensi sebagai antibakteri dari ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* tersebut.

Berdasarkan latar belakang, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* terhadap bakteri lain dan kandungan metabolit sekunder berdasarkan kepolarannya yang berpotensi sebagai antibakteri, sehingga pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun waru gunung (*H. macrophyllus*) dan fraksinya terhadap *S. aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang tersebut rumusan masalah yang akan diungkap dalam penelitian ini antara lain:

1. Apakah ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* dan fraksinya (fraksi n-heksana, etil asetat, dan air) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*?
2. Apakah nilai diameter hambat ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* dan fraksinya (fraksi n-heksana, etil asetat, dan air) memiliki perbedaan yang signifikan?

1.3 Tujuan Penelitian

Dari penelitian ini tujuan yang ingin dicapai antara lain:

1. Untuk mengetahui apakah ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* dan fraksinya (fraksi n-heksana, etil asetat, dan air) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*.
2. Untuk mengetahui nilai diameter hambat antara ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* dan fraksinya (fraksi n-heksana, etil asetat, dan air) memiliki perbedaan yang signifikan atau tidak.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini dapat diperoleh beberapa manfaat antara lain:

1. Memberikan informasi kepada masyarakat tentang potensi daun waru gunung (*H. macrophyllus*) sebagai agen antibakteri terhadap *S. aureus*.
2. Meningkatkan kemampuan peneliti dalam melakukan uji antibakteri.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan *Staphylococcus aureus*

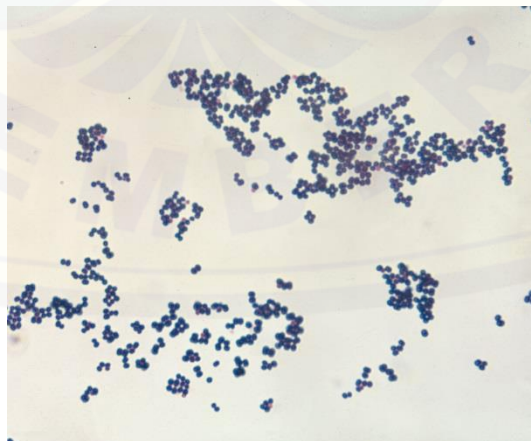
2.1.1 Sistem klasifikasi

Klasifikasi *S. aureus* menurut ITIS Global (2019) antara lain:

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Posibacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2.1.2 Morfologi dan Patogenesis

S. aureus merupakan bakteri gram positif mirip seperti anggur berbentuk bulat bergerombol ketika diamati menggunakan mikroskop. Bakteri ini memiliki diameter 1,0 μm tidak bergerak dan tidak membentuk spora. Koloni bakteri ini membentuk rantai dan bervariasi dari berwarna kuning, kuning emas tua, hingga abu-abu (Jawetz dkk., 2007).



Gambar 2.1 Morfologi bakteri *S. aureus* (Jawetz dkk., 2007)

S. aureus membentuk pigmen yang paling baik pada suhu kamar (21°C) namun juga dapat tumbuh dengan cepat pada suhu 37°C. Pigmen yang dihasilkan

bervariasi dari kuning tua hingga abu-abu. Bakteri ini dapat meragikan karbohidrat dan memiliki metabolisme aktif. Media yang digunakan untuk pembiakan bakteri ini antara lain Agar Gliseril Monostearat, Agar Mueller Hinton, dan Nutrient Agar. *S. aureus* tumbuh pada pH 4,0-9,8 dan tumbuh optimum pada pH 7,0-7,5. Pertumbuhan yang optimal memerlukan 11 asam amino dan tidak tumbuh pada media sintetik karena tidak ada asam amino ataupun protein. (Jawetz dkk., 2007).

S. aureus menginfeksi manusia pada bagian membran mukosa, daerah nasal, saluran pencernaan dan saluran pernapasan yang mengakibatkan infeksi yang berbentuk nanah dan toksin pada manusia. *S. aureus* menyebabkan infeksi seperti endokartitis, meningitis, mastitis, pneumonia, bisul, dan lain-lain. *S. aureus* membentuk enterotoksin yang stabil pada suhu tinggi yang menyebabkan gejala keracunan makanan seperti diare dan mual muntah (Jawetz dkk., 2007).

2.2 Tinjauan *Hibiscus macrophyllus*

2.2.1. Klasifikasi *H. macrophyllus*

Klasifikasi tumbuhan *H. macrophyllus* menurut ITIS Global (2019) antara lain:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Super Divisi	: Embryophyta
Divisi	: Tracheophyta
Sub Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Super Ordo	: Rosanae
Ordo	: Malvales
Famili	: Malvaceae
Genus	: <i>Hibiscus</i>
Spesies	: <i>Hibiscus macrophyllus</i>



Gambar 2.2 A. Pohon *H. macrophyllus*, B. Daun *H. macrophyllus* (Dokumentasi Pribadi)

2.2.2. Nama Lokal dan Sebaran Tumbuh

H. macrophyllus memiliki nama lokal yang berbeda beda tiap daerah. Daerah Jawa tanaman ini memiliki nama waru, waru gombang, waru lanang, waru

payung, waru batang. Daerah Sunda diberi nama tisuk, tesuk, dan tisuk tembaga. Etnik Batak menyebut tanaman ini adalah anak-anak. *H. macrophyllus* dapat tumbuh pada tanah dengan ketinggian 1 sampai 1400 m di atas permukaan laut (mdpl). Tanaman ini tersebar sangat luas di Indonesia diantaranya pulau Sumatera, Jawa, Kalimantan Timur dan Kalimantan Selatan (Suranto, 2015).

2.2.3. Morfologi *H. macrophyllus*

H. macrophyllus memiliki pohon dengan ketinggian hingga 20 meter dengan seluruh permukaan berbulu halus, berbatang silindris, berwarna keabuan. Memiliki helaian daun yang besar dengan diameter 20-40 cm berbentuk bangun jantung, pangkal daun melekok ke dalam, ujung lancip, permukaan yang berbulu, berwarna hijau kecoklatan, dan tepi bergerigi. Bunga tersusun dalam karangan pada ujung percabangan berbentuk payung hingga 30 cm. mahkota bunga berdiameter 5-7 cm berwarna kuning, kelopak bunga berwarna hijau kecoklatan. Buah berbentuk kotak berukuran 3-4 cm dan akan pecah jika masak. Biji berukuran kecil dan berwarna coklat. (Qomah dkk., 2015)

2.2.4. Kandungan dan Manfaat

Di Jawa *H. macrophyllus* dimanfaatkan kayunya sebagai bahan bangunan dan bahan baku rumah, terutama kayu besar, panjang, dan lurus. Di Hawaii dan Filipina tumbuhan ini dimanfaatkan sebagai tanaman hias yang berukuran kecil (bonsai) (Sastrapradja dkk., 1980). Daun tumbuhan genus *Hibiscus* memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan, dan antitirozinase (Salem dkk., 2014). *H. macrophyllus* memiliki kandungan metabolit sekunder antara lain senyawa flavonoid, alkaloid, polifenol, saponin, steroid, triterpenoid dan tannin. Ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus cereus* (Agustina, 2017).

2.3. Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan kandungan senyawa kimia menggunakan pelarut cair yang sesuai sehingga terpisah dari bahan yang tidak

dapat larut. Simplisia memiliki kandungan metabolit sekunder seperti alkaloid, fenol, flavonoid, dan golongan minyak atsiri. Dengan diketahuinya metabolit sekunder yang terkandung pada simplisia baik simplisia nabati maupun hewani maka akan mempermudah mengetahui cara ekstraksi yang sesuai dan pemilihan pelarut yang tepat. (Departemen Kesehatan RI, 2000)

Ekstrak merupakan sediaan kental atau kering yang diperoleh dari senyawa aktif simplisia baik hewani maupun nabati yang di ekstraksi menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan hingga tersisa masa atau serbuk dan diperlakukan sedemikian sampai memenuhi baku yang telah ditetapkan. (Departemen Kesehatan RI, 2000). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah pelarut etanol 96%. Etanol digunakan sebagai pelarut karena memiliki polaritas yang tinggi, mudah menguap, banyak digunakan (bersifat universal), aman digunakan (tidak merusak komponen dari daun), dan mudah didapat. (Azis dkk., 2014).

Terdapat beberapa metode ekstraksi yang umum digunakan untuk bahan alam antara lain maserasi, soxhlet, perkolasi, ultrasonikasi, digesti, refluks, dekok, dan infusa (Sarker dkk, 2006). Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah ultrasonikasi. Metode ultrasonikasi memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya, antara lain metode ultrasonik lebih aman, proses ekstraksi lebih singkat, membutuhkan pelarut yang tidak banyak, dan meningkatkan jumlah rendemen kasar. Metode ultrasonik menggunakan gelombang ultrasonik yaitu gelombang akustik dengan frekuensi lebih besar dari 16-20 kHz. Ultrasonik dapat diadaptasikan ke berbagai aplikasi dengan mudah (Zou dkk., 2014).

2.4. Metode Fraksinasi

Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu senyawa atau golongan senyawa berdasarkan kepolarannya. Teknik fraksinasi terbagi menjadi dua jenis yakni fraksinasi cair-cair dan fraksinasi padat-cair (Harborne, 1998). Fraksinasi cair-cair merupakan proses pemisahan yang dilakukan berdasarkan perbedaan dua pelarut yang tidak saling bercampur. Metode ini menggunakan prinsip "*like dissolve*

like” yaitu tingkat kelarutan senyawa dengan dua pelarut berdasarkan kepolarannya. Metode ini dilakukan dengan memasukkan pelarut yang berbeda kepolarannya kedalam corong pisah kemudian digojog pelan dan didiamkan. Masing-masing senyawa akan larut sesuai dengan tingkat kepolarannya, kemudian akan terbentuk dua fase yakni fase atas dan fase bawah. Fraksinasi padat-cair merupakan proses pemisahan yang dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan cara fase gerak dan senyawa terlarut mengalir melalui kolom dengan laju berbeda yang dipengaruhi gaya gravitasi (Houghton dan Raman, 2012).

Pada penelitian ini menggunakan metode fraksinasi cair-cair. Air bertindak sebagai fase polar ditambahkan pada sampel dan selanjutnya ditambahkan pelarut secara berurutan berdasarkan tingkat kepolarannya, yaitu semipolar-non polar. Pelarut yang digunakan sesuai urutan tingkat kepolaran dari yang tinggi ke yang rendah yaitu etanol 96%-air, etil asetat, dan n-heksana. Metode fraksinasi ini dipilih karena memiliki beberapa keuntungan, antara lain biaya yang murah, kerja sederhana, tidak membutuhkan alat khusus, dan dapat memisahkan senyawa dalam jumlah banyak (Pereira dkk., 2013).

2.5. Metode Pengujian Antibakteri

Uji antibakteri dibagi menjadi tiga metode yaitu metode difusi, metode dilusi, dan metode bioautografi (Cos dkk., 2006). Pada penelitian ini menggunakan metode difusi cakram. Pada metode difusi cakram, larutan uji atau ekstrak diteteskan pada kertas cakram (diameter 6 mm) kemudian diletakkan pada permukaan agar yang diinokulasi mikroba uji. Selanjutnya diinkubasi pada kondisi sesuai dengan pedoman CLSI (Choma dan Grzelak, 2011). Metode ini praktis dan sederhana, menggunakan kertas cakram berporos dalam pengerjaannya bersifat kualitatif. Metode ini memiliki beberapa keuntungan antara lain sederhana, murah, pengamatan dan pengukuran langsung secara visual, peralatan dan bahan yang mudah didapatkan, diameter hambatan secara langsung responsif terhadap konsentrasi antibiotik, efisiensi dan sensitivitasnya tinggi (Davis dan Stout, 1971).

2.6. Antibiotik Gentamisin

Antibiotik Gentamisin termasuk dalam golongan aminoglikosida yang efektif melawan gram positif dan negatif. Antibiotik ini diisolasi dari *Micromonospora purpurea*. Antibiotik Gentamisin sulfat menghambat beberapa bakteri golongan *Staphylococcus* dan bakteri gram negatif yang lain pada dosis 2-10 µg/mL. Gentamisin aktif dalam terapi tunggal tapi juga bersinergis dengan antibiotik golongan beta laktam dalam menghambat bakteri gram negatif (Katzung dkk., 2009).

Mekanisme kerja gentamisin adalah berikatan pada protein ribosomal subunit 30S dan merusak membran sel bakteri yang bersifat letal dan *irreversibel* dengan menghambat sintesis protein. Gentamisin akan menghasilkan efek bakterisidal yang poten jika dikombinasikan dengan penisilin dan vancomycin. Gentamisin digunakan pada beberapa infeksi utama seperti pneumonia dan sepsis. (Katzung dkk., 2009).

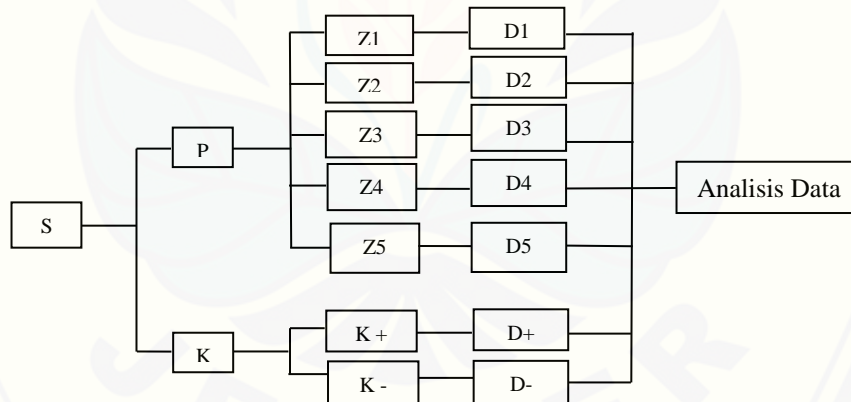
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun waru gunung (*H. macrophyllus*) dan fraksinya terhadap bakteri *S. aureus* merupakan penelitian *true experimental laboratories*.

3.2. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah desain eksperimen sederhana (*the post test only control group design*). Uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini dilakukan dengan metode difusi cakram. Penelitian terbagi atas kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Aktivitas antibakteri pada dua kelompok tersebut ditunjukkan oleh terbentuknya diameter zona hambat disekitar kertas cakram. Rancangan penelitian pada penelitian ditunjukkan pada gambar 3.1 sebagai berikut:



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian aktivitas antibakteri

Keterangan :

- | | | | |
|----|---|-------|---|
| S | = Sampel | D+ | = Hasil data kontrol positif |
| P | = Kelompok perlakuan (ekstrak dan fraksi) | D- | = Hasil data kontrol negatif |
| K | = Kelompok Kontrol | Z1-Z5 | = Konsentrasi larutan sampel ekstrak dan sampel fraksi (5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%) |
| K+ | = Kontrol Positif (Gentamisin) | D1-D5 | = Hasil data diameter hambat (X1-X5) (ekstrak dan fraksi) |
| K- | = Kontrol Negatif (DMSO 10% steril) | | |

3.3. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Juli 2019 – Desember 2019 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain spatula logam, alat-alat gelas, alat penggiling, neraca analitik (Sartorius CP224S), ultrasonikator, vortex (Labnet), corong buchner, oven (Mettler), jarum ose, pembakar spiritus, *yellow tip*, *blue tip*, cawan petri, *mikropipet* (SOCOREX ASBA S.A), inkubator (Gallenkamp), autoklaf (ALP), *hot plate*, *rotary evaporator* (Heidolph), corong pisah, *laminar air flow* (Airtech), jangka sorong, aluminium foil, kertas saring, *microtip*, *microtube*, plat tetes, *plastic wrap*.

3.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi dan fraksinasi antara simplisia daun *H. Macrophyllus* (diambil dari desa Glantangan kecamatan Tempurejo Kabupaten Jember), etanol 96%, n-heksana p.a, etil asetat p.a. Bahan yang digunakan untuk uji antibakteri antara lain DMSO (Dimetil Sulfoksida) 10%, aquades steril, standar Mc Farland 0.5, dan NaCl fisiologis steril. Bakteri uji yang digunakan adalah *S. aureus*. Media yang digunakan untuk peremajaan bakteri metode difusi adalah Agar *Mueller Hinton* (MHA). Kontrol positif yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah gentamisin cakram 10 µg.

3.5. Variabel Penelitian dan Variabel Operasional

3.5.1. Variabel Bebas

Pada penelitian ini variabel bebas adalah konsentrasi uji ekstrak etanol 96% dan fraksinya (fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air) daun waru gunung (*H. macrophyllus*).

3.5.2. Variabel Terikat

Pada penelitian ini variabel terikat adalah nilai diameter zona hambat ekstrak etanol 96% dan fraksinya (fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air) daun waru gunung terhadap *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada media agar *Mueller Hinton* (MHA).

3.5.3. Variabel Terkendali

Pada penelitian ini variabel terkontrol adalah proses sterilisasi, metode ekstraksi ultrasonikasi daun waru gunung, metode fraksinasi, lama waktu inkubasi, prosedur penelitian dan cara pengukuran untuk uji antibakteri.

3.6. Definisi operasional

- a. Pada penelitian ini aktivitas antibakteri diukur berdasarkan diameter zona hambat.
- b. Diameter zona hambat adalah zona bening disekitar cakram yang diukur dengan menggunakan jangka sorong.

3.7. Rancangan Penelitian

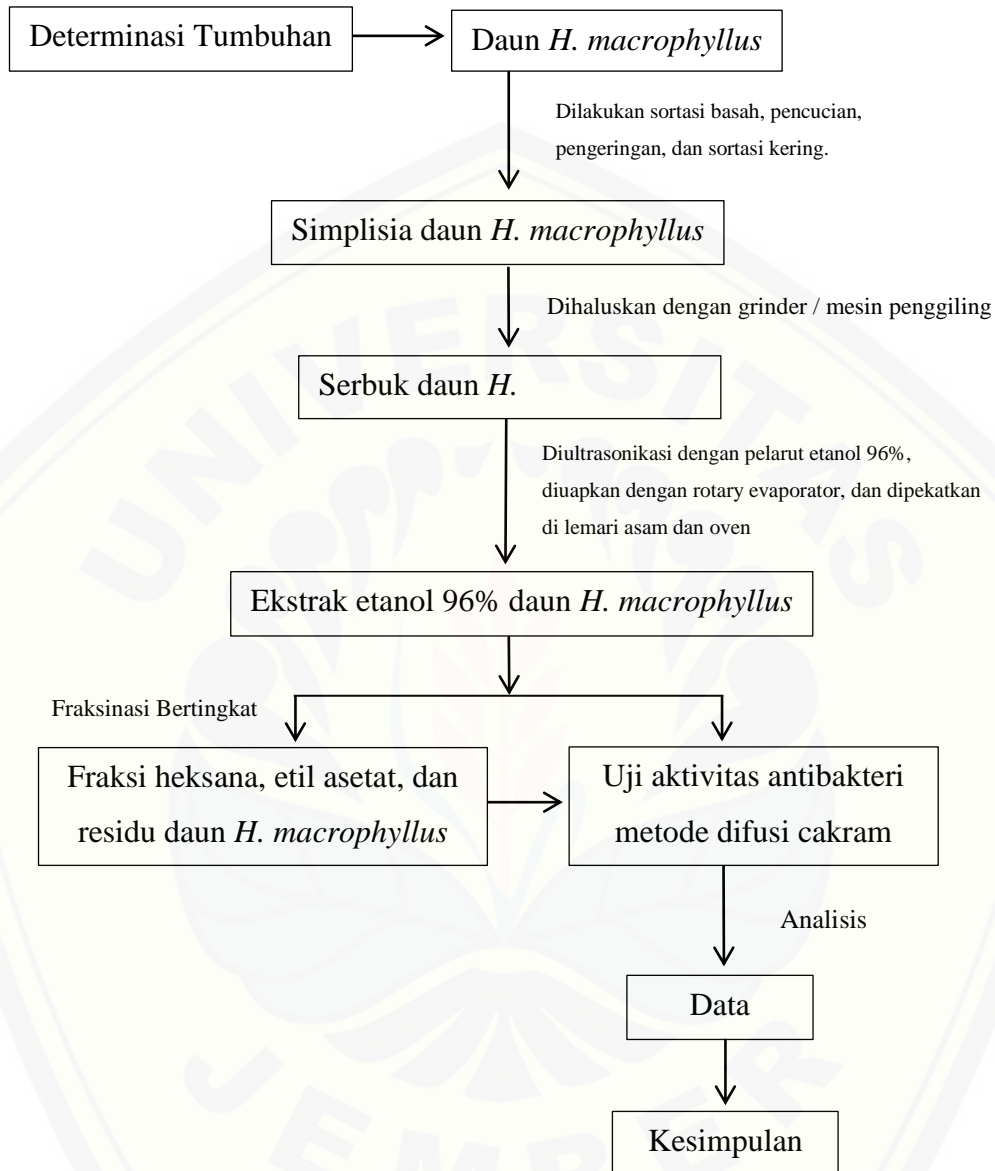
3.7.1. Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini mencakup uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% dan fraksinya daun waru gunung (*H. macrophyllus*) terhadap bakteri *S. aureus*. Tahap awal penelitian adalah pengambilan sampel daun waru gunung kemudian sampel disortasi dan dikeringkan tanpa terpapar sinar matahari langsung hingga menjadi simplisia. Selanjutnya dilakukan proses *grinding* hingga simplisia daun waru gunung menjadi serbuk.

Serbuk daun waru gunung kemudian diberi pelarut etanol 96% kemudian diultrasonikasi selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram setelah didapatkan ekstrak etanol 96%. Ekstrak etanol daun *H. macrophyllus* diukur zona hambatnya. Seluruh data kemudian dianalisis.

3.7.2. Skema Penelitian

Skema alur penelitian dapat dilihat pada gambar 3.2 dibawah ini.



Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

3.8. Prosedur Penelitian

3.8.1. Pengumpulan Sampel dan Determinasi Tanaman

Sampel yang digunakan adalah daun yang diambil secara acak dari tumbuhan waru gunung *H. macrophyllus*. Daun *H. macrophyllus* tumbuh di kebun warga Desa Glantangan Kecamatan Tempurejo Kabupaten Jember. Pengambilan dilakukan pada bulan Maret 2019 yang selanjutnya dideterminasi di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember.

3.8.2. Pembuatan Simplisia dan Serbuk Daun

Sampel tanaman daun waru gunung yang diperoleh disortasi basah, kemudian dicuci untuk menghilangkan kotoran. Daun waru gunung dikeringkan selama 14 hari tanpa sinar matahari langsung dan diangin-anginkan hingga menjadi kering ditandai dengan hancur saat diremas. Setelah daun waru gunung kering, daun waru gunung dilakukan proses grinding dengan alat penggiling dan serbuk dimasukkan ke dalam plastik kering.

3.8.3. Proses Ekstraksi

Metode ekstraksi daun waru gunung mengacu pada metode Agustina (2017) 250 gram serbuk daun *H. macrophyllus* dilarutkan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 2 liter (perbandingan 1:8), kemudian proses ekstraksi menggunakan metode ultrasonikasi selama 1 jam menggunakan ultrasonikator. Kemudian disaring menggunakan kertas saring melalui corong *Buchner* dan didapatkan filtrat. Filtrat dipisahkan menggunakan *vaccum rotary evaporator* pada suhu 50°C kemudian dikeringkan dalam oven hingga diperoleh ekstrak kental. Perhitungan rendemen ekstrak menggunakan persamaan rumus 3.1:

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} : \frac{\text{berat ekstrak kental (g)}}{\text{berat serbuk (g)}} \times 100\%$$

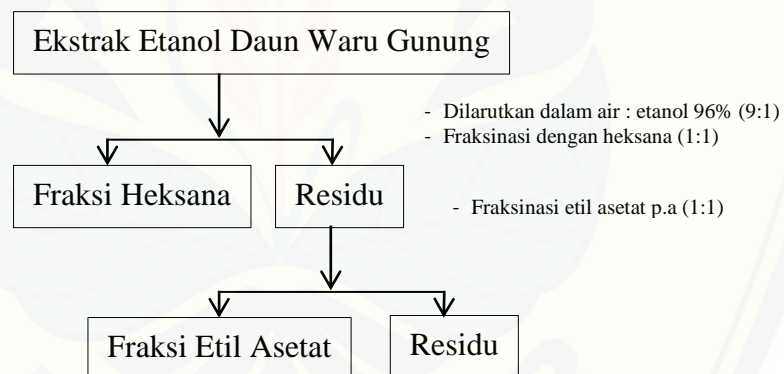
3.8.4. Metode Fraksinasi

Setelah diperoleh ekstrak kental, ekstrak difraksinasi dengan cara pastisi cair-cair dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol 96%-air (perbandingan

1:9). Sebanyak 10 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 ml etanol 96%, setelah larut kemudian ditambahkan aquades sebanyak 90 ml. Larutan tersebut dipartisi dengan menambahkan 100 ml n-heksana p.a (perbandingan 1:1), dikocok dalam corong pisah kurang lebih 15 menit dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan (pada lapisan atas n-heksana dan pada lapisan bawah etanol 96%-air). Lapisan n-heksana diambil dan dilakukan tiga kali penambahan n-heksana hingga menjadi bening, lapisan etanol 96%-air kemudian difraksinasi kembali menggunakan pelarut etil asetat p.a dengan cara yang sama dan didapatkan air. Hasil fraksinasi dari n-heksana, etil asetat, dan air ditampung selama beberapa waktu kemudian dipekatkan dalam lemari asam dan oven hingga diperoleh fraksi kental untuk digunakan sebagai sampel pengujian antibakteri (Sembiring dkk., 2016).

Perhitungan rendemen ekstrak menggunakan persamaan rumus 3.2:

$$\text{Rendemen fraksi (\%)} : \frac{\text{berat fraksi (g)}}{\text{berat ekstrak (g)}} \times 100\%$$



Gambar 3.3 Skema Fraksinasi

3.8.5. Sterilisasi Alat dan Bahan

1. Sterilisasi dengan pemijaran adalah sterilisasi dengan cara pembakaran alat-alat diatas lampu spiritus seperti jarum ose, spreader kaca dan pinset.
2. Sterilisasi dengan uap yang bertekanan (autoklaf) adalah sterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat yang disterilisasi seperti : alat-alat gelas, *yellow tip*, *blue tip*, aquades steril, media Nutrient Agar (NA), media Mueller Hinton (MHA), dan NaCl fisiologis.

3.8.6. Pembuatan Media

1. Nutrient Agar (NA)

Pembuatan media NA dilakukan dengan menimbang serbuk NA sebanyak 0,69 gram dilarutkan dalam 30 ml aquades lalu dipanaskan sampai mendidih dan tepat larut. Larutan media dituangkan ke dalam 6 tabung reaksi dengan volume masing-masing 5 mL. Media NA disterilkan menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian Media NA steril dimiringkan hingga terbentuk agar miring. Perhitungan pembuatan media NA ditunjukkan pada lampiran C.

2. Media Mueller Hinton Agar (MHA)

Pembuatan media MHA dilakukan dengan menimbang serbuk MHA sebanyak 13,68 gram dilarutkan dalam 360 mL aquades dan dipanaskan sampai mendidih hingga semuanya larut. Larutan media dituangkan ke dalam 24 tabung reaksi dengan volume 15 mL. Media kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Perhitungan pembuatan media MHA ditunjukkan pada lampiran C.

3. Pembuatan Standart Mc Farland 0,5

Sebanyak 0.05 mL BaCl₂ 1% dicampur dengan 9.95 mL H₂SO₄ 1% sehingga setara dengan 1 x 10⁸ CFU (koloni/mL) (CLSI, 2012).

3.8.7. Peremajaan Biakan Bakteri

Biakan bakteri murni diremajakan pada media *Nutrient Agar* (NA) dalam tabung reaksi dengan cara menggoreskan pada media NA miring. Proses tersebut dilakukan secara aseptis yaitu dengan mendekatkan mulut tabung reaksi pada nyala api dalam Laminar Air Flow (LAF). Setelah itu, media dalam tabung reaksi yang berisi bakteri ditutup rapat dengan menggunakan kapas dan plastic wrap kemudian diinkubasi selama 18 jam dalam inkubator pada suhu 37°C.

3.8.8. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *S. aureus* dari kultur biakan murni diambil menggunakan jarum ose steril, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL NaCl

fisiologis steril secara aseptis lalu divortex hingga larut. Kekeruhan suspensi bakteri diperiksa menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm dengan absorbansi yang ditargetkan adalah 0,08-0,13 (CLSI, 2012).

3.8.9. Pembuatan larutan uji antibakteri

Uji aktivitas antibakteri metode difusi cakram dilakukan menggunakan lima konsentrasi ekstrak etanol daun waru gunung dan lima konsentrasi larutan uji fraksi yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%. Diawali dengan membuat larutan induk 25% kemudian di encerkan dengan DMSO 10% menjadi konsentrasi 5%, 10%, 15%, dan 20%. Perhitungan pembuatan larutan uji dan DMSO 10% ditunjukkan pada lampiran C

3.8.10. Kontrol positif dan kontrol negatif

Kontrol positif menggunakan cakram gentamisin 10 µg dan kontrol negatif menggunakan DMSO 10% steril.

3.8.11. Uji aktivitas antibakteri metode difusi cakram

Uji antibakteri ekstrak dan fraksi dengan metode difusi cakram dilakukan masing-masing dua kelompok yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan berisi lima cakram yang sudah didiamkan dengan larutan uji ekstrak dan larutan uji fraksi sebanyak 15 µL pada plat tetes dengan konsentrasi masing-masing 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%. Kelompok kontrol berisi cakram yang didiamkan dalam DMSO 10% steril (kontrol negatif) dan cakram gentamisin 10 µg (kontrol positif). Selanjutnya 15 ml larutan media MHA di masukkan ke dalam empat cawan petri steril, 1 cawan petri untuk larutan uji ekstrak dan tiga cawan petri untuk larutan uji fraksi. Suspensi bakteri dalam NaCl fisiologis 0,9% yang turbiditasnya sesuai dengan standar Mc Farland 0,5 dipipet sebanyak 100 µL dan dimasukkan ke dalam masing-masing cawan petri, kemudian suspensi diratakan dengan spreader kaca. Kemudian letakkan cakram yang berisi larutan uji dan dua cakram kontrol ke dalam masing- masing cawan petri. Selanjutnya

masing-masing cawan petri yang berisi cakram perlakuan dan cakram kontrol diinkubasi selama 18 jam dalam inkubator pada suhu 37°C. Kemudian zona bening yang terbentuk sekitar cakram diukur diameternya dengan jangka sorong.

3.8.12. Analisis Data

Seluruh sampel dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Aktivitas antibakteri dari senyawa uji diketahui berdasarkan zona bening yang terbentuk disekitar cakram dalam cawan petri yang telah diinokulasi *S. aureus*. Data yang diperoleh berupa data kuantitatif dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Kemudian dilakukan uji *One way ANOVA* jika diperoleh data normal dan homogen. Jika data yang terdistribusi tidak normal dan homogen maka dilakukan uji analisis statistika alternatif menggunakan *Kruskall Wallis*. Jika data yang diperoleh melalui uji *one way ANOVA* telah berbeda signifikan, maka dilanjutkan analisis statistika dengan *LSD post hoc*. Hasil uji dianggap berbeda signifikan apabila nilai $p < 0,05$ dengan tingkat kepercayaan 95% (Sudjana, 2000).

Respon kemampuan hambat pertumbuhan bakteri diklasifikasikan pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Klasifikasi respon kemampuan hambat pertumbuhan bakteri

Diameter Zona Hambat	Respon Hambat Pertumbuhan
≥ 20 mm	Kuat
15-19 mm	Sedang
≤ 14 mm	Lemah

Sumber : CLSI (2012)

BAB 5. PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol daun waru gunung (*H. Macrophyllus*) dan fraksinya memiliki aktivitas antibakteri, kecuali fraksi air tidak memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%.
2. Pada penelitian ini semua sampel uji kecuali fraksi air memberikan daya hambat bakteri yang berbeda signifikan pada konsentrasi 5%, 10%, dan 25% namun pada konsentrasi 15% dan 20% tidak adanya perbedaan yang signifikan. Pada sampel ekstrak dan fraksi etil asetat menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan pada semua konsentrasinya.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka saran untuk penelitian selanjutnya adalah:

1. Perlu penelitian lebih lanjut terkait skrining fitokimia pada fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol 96% daun waru gunung (*H. macrophyllus*) untuk memastikan metabolit sekunder yang terkandung tiap fraksi.
2. Perlu dilakukan isolasi senyawa terhadap fraksi daun waru gunung (*H. macrophyllus*) untuk memastikan kandungan senyawa kimia spesifik yang paling berpotensi sebagai sebagai antibakteri.
3. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri daun waru gunung (*H. macrophyllus*) secara *in vivo*
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut aktivitas antibakteri daun waru gunung (*H. macrophyllus*) terhadap bakteri gram positif dan gram negatif lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, R. P. 2017. Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Waru Gunung (*H. macrophyllus* Roxb. Ex Hornem) Terhadap *Bacillus cereus*. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Azis, T., S. Febrizky, dan A. D. Mario. 2014. Pengaruh jenis pelarut terhadap persen yield alkaloid dari daun salam india (*Murraya koenigii*). *Tehnik Kimia*. 20(2):1–6.
- Bibi, Yamin., S. Nusa, F. M. Chaudhary, dan M. Zia. 2011. Anibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. *BMC Complementary and Altenative Medicine* 11: 52.
- Choma, I. M. dan E. M. Grzelak. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1218(19):2684–2691.
- CLSI. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition*. Wayne. 2. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Cos, P., A. J. Vlietinck, D. Vanden Berghe, dan L. Maes. 2006. Anti-infective Potential of Natural Products: How to Develop a Stronger in Vitro “Proof-of- Concept”. *Journal of Ethnopharmacology*. 106(3):290–302.
- Davis, W. W. dan T. R. Stout. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. I: factors influencing variability and error. *Applied Microbiology*. 22(4):659–665.
- Departemen Kesehatan RI. 1980. *Materia Medika Indonesia Jilid IV*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan.
- Departemen kesehatan. 2008. *Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2007*. Jakarta: Departemen kesehatan RI.
- Harborne, J. B. 1998. *Phytochemical Methods; A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. New York: Chapman And Hall. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Houghton, P. J. dan A. Raman. 2012. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Springer.

- ITIS (*Integrated taxonomic information system*), 2019. Taxonomic Hierarchy: *H. macrophyllus* Roxb. ex Hornem.
www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=502997#null (Diakses pada 8 November 2019)
- ITIS (*Integrated taxonomic information system*), 2019. Taxonomic Hierarchy: *Staphylococcus aureus*.
https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=969622#null (Diakses pada 8 November 2019)
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg's. 2007. *Medical Microbiology*. Edisi 24th. New York: Mc Graw Hill.
- Katzung, B. G., S. B. Masters, dan J. T. Anthony. 2009. *Basic and Clinical Pharmacology*. Edisi 11. San Fransisco: Mc Graw Hill.
- Kemendes RI. 2018. *Hasil Utama Riskesdas 2018*. Jakarta: Kemendes RI
- Kuswandi, M. 2011. Strategi Mengatasi Bakteri yang Resisten terhadap Antibiotika. *Pengukuhan Jabatan Guru Besar (10-12)*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Mardiastuti, H. W., A. Karuniawati, A. Kiranasari, Ikaningsih, dan R. Kadarsih. 2007. *Emerging resistance pathogen: situasi terkini di Asia, Eropa, Amerika Serikat, Timur Tengah dan Indonesia*. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 57(3): 75-79.
- Pereira, J., J. Gonçalves, V. Alves, dan J. S. Câmara. 2013. Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: recent applications and future trends. *Sample Preparation*. 1
- Qomah, I., S. A. Hariani, dan S. Murdiyah. 2015. Identifikasi tumbuhan berbiji (spermatophyta) di lingkungan kampus universitas jember. *Bioedukasi*. XIII(2):13-20.
- Ramproshad, S., T. Afroz, B. Mondal, A. Haque, S. Ara, R. Khan, dan S. Ahmed. 2012. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Leaves of Medicinal Plant *Hibiscus tiliaceus* L. *Pharmacologyonline*. 3:82-87
- Reynolds, J. E. F. 1996. *Martindale, The Extra Pharmacopeia 31th Edition*. Edisi 31. London: The Royal Pharmaceutical Society Press.
- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, Edisi VI, Hal 191-216, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung.

- Salem, M. Z. M., J. Olivares-Pérez, dan A. Z. M. S. 3. 2014. Studies on Biological Activities and Phytochemicals Composition of *Hibiscus* species- a review. *Life Science Journal*. 63(10):1–7.
- Sarker, S. D., Z. Latif, dan A. I. Gray. 2006. *Natural Product Isolation Second Edition*. New Jersey, USA: Human Press.
- Sastrapradja, Setijati., K. Kuswata, S. Usep, Roemantyo, W. Hari, S. Soekristijono. 1980. *Kayu Indonesia*. Jakarta: LBN - LIPI bekerjasama dengan Balai Pustaka. 14:14-15.
- Sekar, M., H. Hashim, F. Fadzil, S. Sukaini, N. Zukhi, M. Nadzri, dan M. Abdullah. 2015. Antibacterial Activity of the Metanolic Extract of *Hibiscus Sabdariffa* Leaves and Fruits. *British Microbiology Research Journal*. 10(5):1–6.
- Sudjana. 2000. *Metode Statistika*. Tarsito, Bandung
- Suranto, Y. 2015. Pengaruh konsentrasi larutan dan durasi perendaman terhadap efektivitas bahan konservan poly etilen glikol dalam pelestarian cagar budaya material kayu. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya*. 9(2):52–62.
- Sembiring, E., M. S. Sangi, dan E. Suryanto. 2016. Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi dari Biji Jagung (*Zea mays* L.). *Chem. Prog*. 9:16–24.
- Tavish, M.H., dan D. H. dan M. Martosupono. 2002. An economic study of essential oil production in the uk: a case study comparing non-uk lavender/lavandin production and peppermint/spearmint production with uk production techniques and cost. *Adas Consulting Ltd*. 137
- Uddin, B., T. Hossan, S. Paul, T. Ahmed, T. Nahar, dan S. Ahmed. 2010. Antibacterial Activity of the Ethanol Extracts of *Hibiscus Rosa-Sinensis* Leaves and Flowers Against Clinical Isolates of Bacteria. *Bangladesh J. Life Sci*. 22(2):65–73.
- Vanden Berghe, D.A. dan Vlietinck, A. J. 1991. *Methods in Plant Biochemistry: Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plants*. London: Academic Press.
- WHO. 2007. Epidemic prone and pandemic prone acute respiratory diseases: infection prevention and control in helath-care facilities. *Who. Indonesia Partner in Development*. 53(2):8–25.
- WHO. 2015. WHO satistical profil indonesia. *Indonesia: WHO Statistical Profil*. 1–3.

Zou, T. Bin, E. Q. Xia, T. P. He, M. Y. Huang, Q. Jia, dan H. W. Li. 2014. Ultrasound-assisted extraction of mangiferin from mango (*Mangifera indica* L.) leaves using response surface methodology. *Molecules*. 19(2):1411–1421.



LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
LABORATORIUM TANAMAN

Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax.(0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 06/PL17.3.1.02/LL/2019

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Farmasi Universitas Jember No: 365/UN25.13/LL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Afif Rifqie Maulana
NIM : 142210101032
Jur/Fak/PT : Fakultas Farmasi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub Kelas: Dilleniidae; Ordo: Malvales; Famili: Malvaceae; Genus: Hibiscus; Spesies: Hibiscus macrophyllus, Roxb.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 15 Pebruari 2019

Ka. Laboratorium Tanaman


I. Lilik Mastuti, MP
NIP. 195808201987032001

Gambar A1. Hasil determinasi tumbuhan Waru Gunung (*H. macrophyllus*)

Lampiran B. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol 96% Daun Waru Gunung (*H. macrophyllus*) dan Fraksinya.



Gambar B1. Hasil rendemen ekstrak etanol 96% dan Fraksinya daun Waru Gunung

Perhitungan Rendemen Ekstrak dan Fraksi:

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{\text{Berat Ekstrak (g)}}{\text{Berat Simplisia (g)}} \times 100\% = \frac{18,68 \text{ g}}{250 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 7,47\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Fraksi N-heksana} &= \frac{\text{Berat Fraksi (g)}}{\text{Berat Ekstrak (g)}} \times 100\% = \frac{4,74 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 47,4\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Fraksi Etil Asetat} &= \frac{\text{Berat Fraksi (g)}}{\text{Berat Ekstrak (g)}} \times 100\% = \frac{0,29 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,9\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen Fraksi Air} &= \frac{\text{Berat Fraksi (g)}}{\text{Berat Ekstrak (g)}} \times 100\% = \frac{3,5 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 35\% \end{aligned}$$

Lampiran C. Perhitungan Pembuatan Media Agar Uji dan Larutan Uji Ekstrak dan Fraksinya

Rumus C.1 Perhitungan Pembuatan Media Nutrient Agar Miring (Na)

Nutrien Agar = 1 Tabung 5 ml (dibuat 6 tabung)

5 ml x 6 tabung = 30 ml (6 tabung)

$$23 \text{ g} = 1000 \text{ ml}$$

$$X \text{ g} = 30 \text{ ml}$$

$$X \text{ g} = \frac{30 \text{ ml} \times 23 \text{ g}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 0,69 \text{ g}$$

Rumus C.2 Perhitungan Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

MHA = 1 Tabung 15 ml (dibuat 24 tabung)

15 ml x 24 tabung = 360 ml (24 tabung)

$$38 \text{ g} = 1000 \text{ ml}$$

$$X \text{ g} = 360 \text{ ml}$$

$$X \text{ g} = \frac{360 \text{ ml} \times 38 \text{ g}}{1000 \text{ ml}}$$

$$X = 13,68 \text{ g}$$

Pembuatan larutan Uji DMSO 10%

Larutan DMSO dibuat dengan cara memipet sebanyak 1 mL larutan DMSO 100% kemudian diencerkan dengan akuades steril sebanyak 9 mL.

Rumus C.3 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Etanol 96% dan Fraksinya

- Membuat Larutan Induk Konsentrasi 25% sebanyak 500 μ l

$$\text{Konsentrasi 25 \%} = \frac{25 \text{ gram}}{100 \text{ ml}} = \frac{125 \text{ mg}}{500 \mu\text{l}} \text{ (menimbang sampel uji 125 mg)}$$

- Membuat Larutan Uji konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% sebanyak 150 μ l dari Larutan Induk.

$$\text{Konsentrasi 5\%} = 250 \text{ mg/ml} \times \text{Vol induk} = 50 \text{ mg/ml} \times 150 \mu\text{l}$$

$$\text{Vol induk} = 30 \mu\text{l ad } 150 \mu\text{l (120 } \mu\text{l DMSO 10\%)}$$

$$\text{Konsentrasi 10\%} = 250 \text{ mg/ml} \times \text{Vol induk} = 50 \text{ mg/ml} \times 150 \mu\text{l}$$

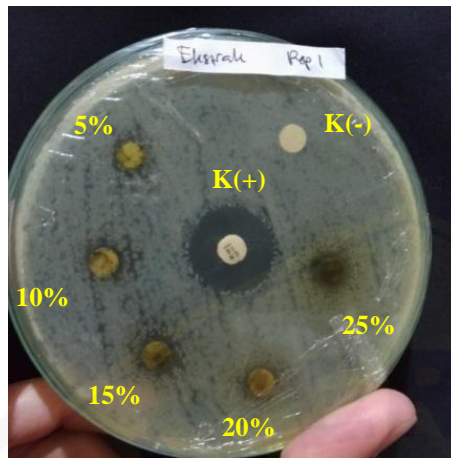
$$\text{Vol induk} = 60 \mu\text{l ad } 150 \mu\text{l (90 } \mu\text{l DMSO 10\%)}$$

$$\text{Konsentrasi 15\%} = 250 \text{ mg/ml} \times \text{Vol induk} = 50 \text{ mg/ml} \times 150 \mu\text{l}$$

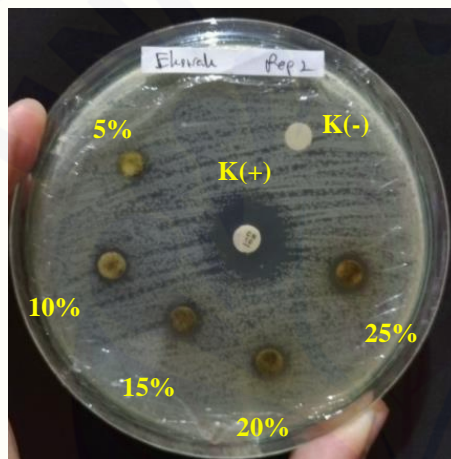
$$\text{Vol induk} = 90 \mu\text{l ad } 150 \mu\text{l (60 } \mu\text{l DMSO 10\%)}$$

$$\text{Konsentrasi 20\%} = 250 \text{ mg/ml} \times \text{Vol induk} = 50 \text{ mg/ml} \times 150 \mu\text{l}$$

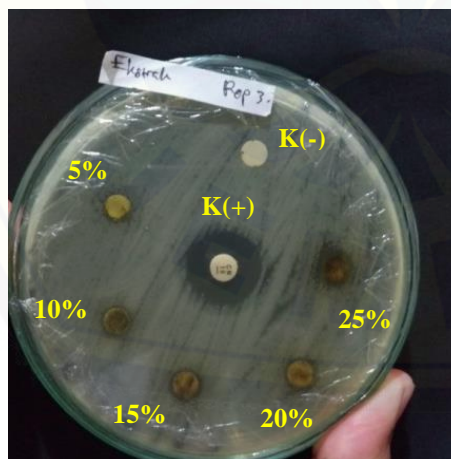
$$\text{Vol induk} = 120 \mu\text{l ad } 150 \mu\text{l (30 } \mu\text{l DMSO 10\%)}$$

Lampiran D. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Semua Sampel Uji

Replikasi 1

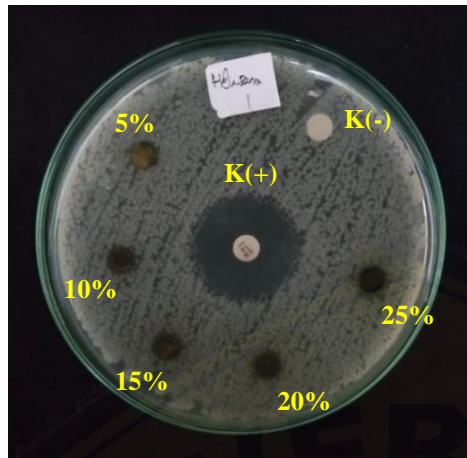


Replikasi 2

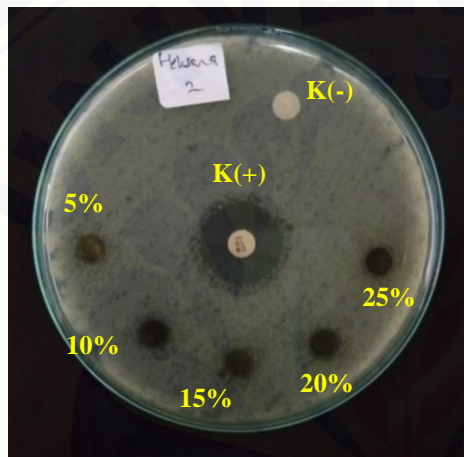


Replikasi 3

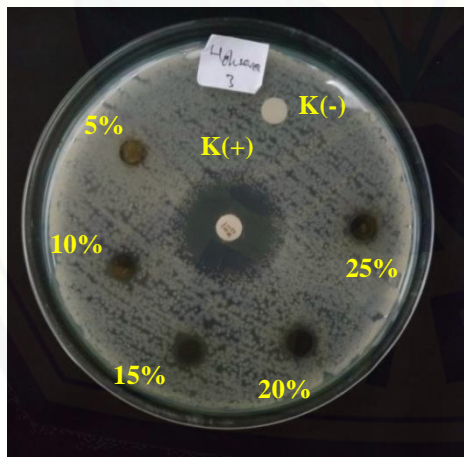
Gambar D1. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun waru gunung (*H. macrophyllus*) dengan konsentrasi uji 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, kontrol positif (cakram gentamisin 10 µg) dan kontrol negatif (DMSO 10%)



Replikasi 1

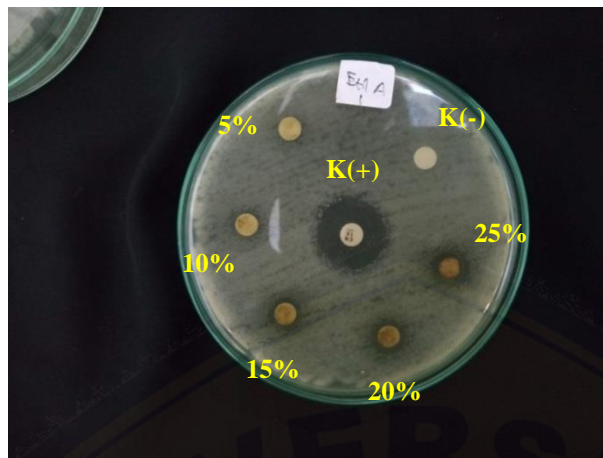


Replikasi 2

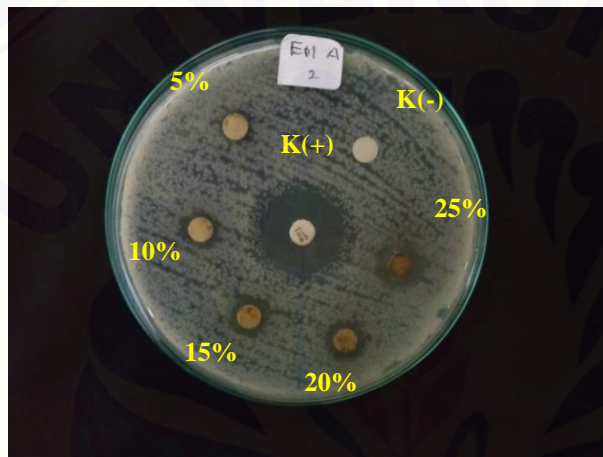


Replikasi 3

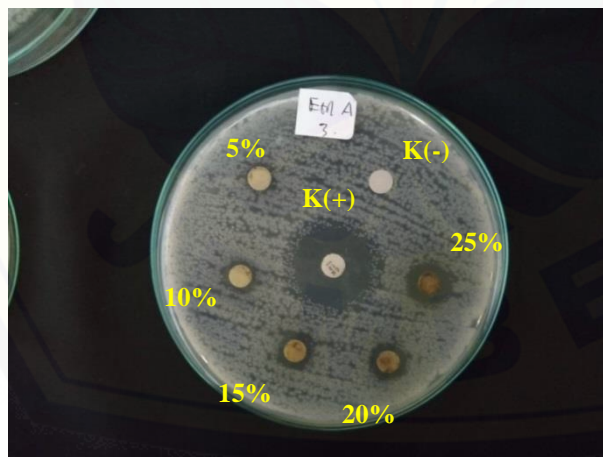
Gambar D2. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun waru gunung (*H. macrophyllus*) dengan konsentrasi uji 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, kontrol positif (cakram gentamisin 10 µg) dan kontrol negatif (DMSO 10%).



Replikasi 1

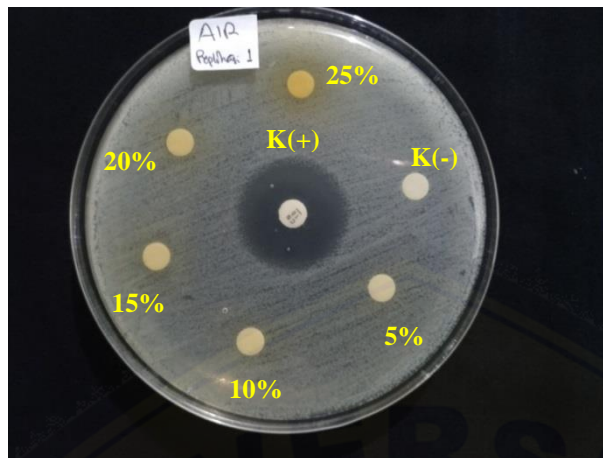


Replikasi 2

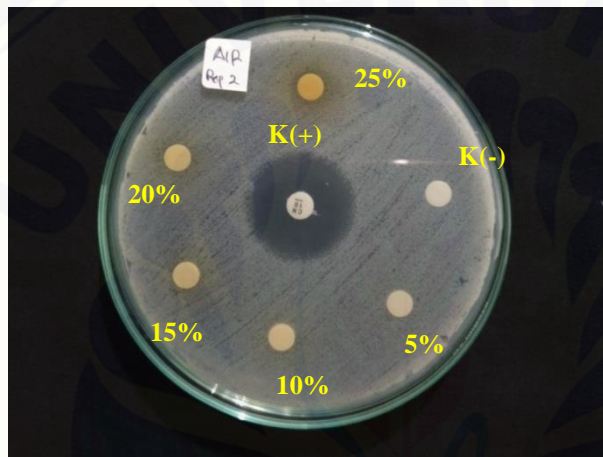


Replikasi 3

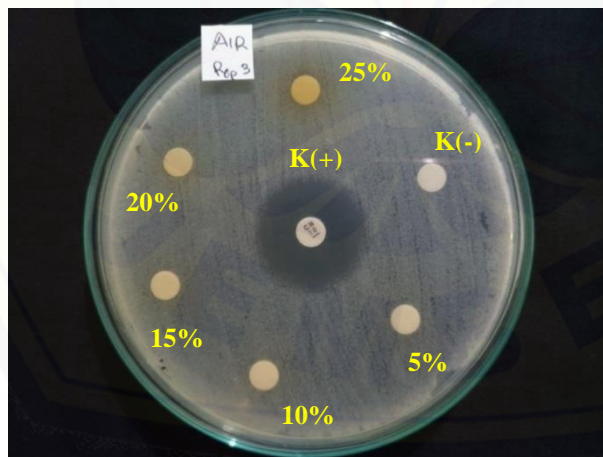
Gambar D3. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun waru gunung (*H. macrophyllum*) dengan konsentrasi uji 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, kontrol positif (cakram gentamisin 10 μ g) dan kontrol negatif (DMSO 10%).



Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3

Gambar D4. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air dari ekstrak etanol daun waru gunung (*H. macrophyllus*) dengan konsentrasi uji 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, kontrol positif (cakram gentamisin 10 µg) dan kontrol negatif (DMSO 10%).

Sampel Uji	Konsentrasi	Diameter zona hambat ekstrak etanol 96% dan fraksinya daun <i>H. macrophyllus</i> terhadap <i>S. aureus</i> (mm)					SD	CV(%)
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata	SD		
Ekstrak Etanol 96%	5%	8,39	8,27	8,10	8,25	0,14	1,74	
	10%	9,13	8,97	8,80	8,97	0,17	1,86	
	15%	9,67	9,87	9,27	9,60	0,31	3,18	
	20%	10,20	10,00	9,93	10,04	0,14	1,38	
	25%	11,67	11,60	11,47	11,58	0,10	0,88	
	Kontrol (+)	18,17	17,91	18,19	18,09	0,16	0,86	
	Kontrol (-)	0	0	0	0	0	-	
Fraksi n-heksana	5%	7,80	7,50	7,47	7,59	0,18	2,42	
	10%	8,33	8,63	7,77	8,24	0,44	5,34	
	15%	10,00	9,30	8,32	9,18	0,89	9,69	
	20%	10,27	9,43	9,23	9,64	0,55	5,68	
	25%	11,07	9,80	10,07	10,31	0,67	6,48	
	Kontrol (+)	19,89	18,42	18,91	19,07	0,74	3,88	
	Kontrol (-)	0	0	0	0	0	-	
Fraksi Etil Asetat	5%	8,50	8,43	7,90	8,28	0,33	3,97	
	10%	9,47	9,83	9,10	9,47	0,37	3,87	
	15%	9,90	10,40	10,90	10,40	0,50	4,81	
	20%	10,07	10,87	11,20	10,71	0,58	5,44	
	25%	11,27	12,23	12,63	12,04	0,70	5,83	
	Kontrol (+)	18,95	19,75	19,82	19,51	0,48	2,48	
	Kontrol (-)	0	0	0	0	0	-	
Fraksi Air	5%	0	0	0	0	0	-	
	10%	0	0	0	0	0	-	
	15%	0	0	0	0	0	-	
	20%	0	0	0	0	0	-	
	25%	0	0	0	0	0	-	
	Kontrol (+)	21,13	21,17	21,11	21,14	0,03	0,14	
	Kontrol (-)	0	0	0	0	0	-	

Tabel D1. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol 96% dan Fraksinya pada Daun Waru Gunung (*H. macrophyllus*) dengan konsentrasi masing-masing 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% terhadap *S. aureus*

Lampiran E. Analisis Data Statistik

1. Uji Normalitas dan Homogenitas diameter zona hambat ekstrak etanol 96% dan fraksinya pada daun waru gunung (*H. macrophyllus*) dengan masing-masing konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% terhadap *S. aureus*

Tests of Normality^{b,c,d,e,f}

konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ekstrak_etanol	5%	,206	3	,993	3	,836
	10%	,175	3	1,000	3	1,000
	15%	,253	3	,964	3	,637
	20%	,292	3	,923	3	,463
	25%	,253	3	,964	3	,637
fraksi_heksana	5%	,353	3	,824	3	,174
	10%	,247	3	,969	3	,664
	15%	,221	3	,986	3	,772
	20%	,317	3	,889	3	,350
	25%	,310	3	,900	3	,384
fraksi_etil_asetat	5%	,349	3	,832	3	,194
	10%	,175	3	1,000	3	1,000
	15%	,175	3	1,000	3	1,000
	20%	,272	3	,947	3	,554
	25%	,273	3	,946	3	,551

a. Lilliefors Significance Correction

b. fraksi_air is constant when konsentrasi = 5%. It has been omitted.

c. fraksi_air is constant when konsentrasi = 10%. It has been omitted.

d. fraksi_air is constant when konsentrasi = 15%. It has been omitted.

e. fraksi_air is constant when konsentrasi = 20%. It has been omitted.

f. fraksi_air is constant when konsentrasi = 25%. It has been omitted.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
ekstrak_etanol	1,254	4	10	,350
fraksi_heksana	1,474	4	10	,281
fraksi_etil_asetat	,710	4	10	,604
fraksi_air	.	4	.	.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ekstrak_etanol	Between Groups	18,864	4	4,716	137,151	,000
	Within Groups	,344	10	,034		
	Total	19,207	14			
fraksi_heksana	Between Groups	14,183	4	3,546	10,044	,002
	Within Groups	3,530	10	,353		
	Total	17,714	14			
fraksi_etil_asetat	Between Groups	23,802	4	5,950	22,445	,000
	Within Groups	2,651	10	,265		
	Total	26,453	14			
fraksi_air	Between Groups	,000	4	,000		
	Within Groups	,000	10	,000		
	Total	,000	14			

2. Hasil Analisis *Post Hoc* LSD antar konsentrasi pada ekstrak etanol 96% dan fraksinya pada daun waru gunung (*H. macrophyllus*)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) konsentrasi	(J) konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
						ekstrak_etanol	5%
		15%	-1,34778*	,15140	,000	-1,6851	-1,0104
		20%	-1,79222*	,15140	,000	-2,1296	-1,4549
		25%	-3,32556*	,15140	,000	-3,6629	-2,9882
	10%	5%	,71444*	,15140	,001	,3771	1,0518
		15%	-.63333*	,15140	,002	-.9707	-.2960
		20%	-1,07778*	,15140	,000	-1,4151	-.7404
		25%	-2,61111*	,15140	,000	-2,9485	-2,2738
	15%	5%	1,34778*	,15140	,000	1,0104	1,6851
		10%	,63333*	,15140	,002	,2960	,9707
		20%	-.44444*	,15140	,015	-.7818	-.1071
		25%	-1,97778*	,15140	,000	-2,3151	-1,6404
	20%	5%	1,79222*	,15140	,000	1,4549	2,1296
		10%	1,07778*	,15140	,000	,7404	1,4151
		15%	,44444*	,15140	,015	,1071	,7818
		25%	-1,53333*	,15140	,000	-1,8707	-1,1960
	25%	5%	3,32556*	,15140	,000	2,9882	3,6629
		10%	2,61111*	,15140	,000	2,2738	2,9485
		15%	1,97778*	,15140	,000	1,6404	2,3151
		20%	1,53333*	,15140	,000	1,1960	1,8707

fraksi_heksana	5%	10%	-,65556	,48514	,206	-1,7365	,4254
		15%	-1,58889*	,48514	,008	-2,6698	-,5079
		20%	-2,05556*	,48514	,002	-3,1365	-,9746
		25%	-2,72222*	,48514	,000	-3,8032	-1,6413
	10%	5%	,65556	,48514	,206	-,4254	1,7365
		15%	-,93333	,48514	,083	-2,0143	,1476
		20%	-1,40000*	,48514	,016	-2,4810	-,3190
		25%	-2,06667*	,48514	,002	-3,1476	-,9857
	15%	5%	1,58889*	,48514	,008	,5079	2,6698
		10%	,93333	,48514	,083	-,1476	2,0143
		20%	-,46667	,48514	,359	-1,5476	,6143
		25%	-1,13333*	,48514	,042	-2,2143	-,0524
	20%	5%	2,05556*	,48514	,002	,9746	3,1365
		10%	1,40000*	,48514	,016	,3190	2,4810
		15%	,46667	,48514	,359	-,6143	1,5476
		25%	-,66667	,48514	,199	-1,7476	,4143
	25%	5%	2,72222*	,48514	,000	1,6413	3,8032
		10%	2,06667*	,48514	,002	,9857	3,1476
		15%	1,13333*	,48514	,042	,0524	2,2143
		20%	,66667	,48514	,199	-,4143	1,7476

fraksi_etil_asetat	5%	10%	-1,18889*	,42041	,018	-2,1256	-,2522
		15%	-2,12222*	,42041	,001	-3,0589	-1,1855
		20%	-2,43333*	,42041	,000	-3,3701	-1,4966
		25%	-3,76667*	,42041	,000	-4,7034	-2,8299
	10%	5%	1,18889*	,42041	,018	,2522	2,1256
		15%	-,93333	,42041	,051	-1,8701	,0034
		20%	-1,24444*	,42041	,014	-2,1812	-,3077
		25%	-2,57778*	,42041	,000	-3,5145	-1,6411
	15%	5%	2,12222*	,42041	,001	1,1855	3,0589
		10%	,93333	,42041	,051	-,0034	1,8701
		20%	-,31111	,42041	,476	-1,2478	,6256
		25%	-1,64444*	,42041	,003	-2,5812	-,7077
	20%	5%	2,43333*	,42041	,000	1,4966	3,3701
		10%	1,24444*	,42041	,014	,3077	2,1812
		15%	,31111	,42041	,476	-,6256	1,2478
		25%	-1,33333*	,42041	,010	-2,2701	-,3966
	25%	5%	3,76667*	,42041	,000	2,8299	4,7034
		10%	2,57778*	,42041	,000	1,6411	3,5145
		15%	1,64444*	,42041	,003	,7077	2,5812
		20%	1,33333*	,42041	,010	-,3966	2,2701

3. Hasil Analisis *Post Hoc* LSD antar sampel ekstrak etanol 96% dan fraksinya pada daun waru gunung (*H. macrophyllus*)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Kontrol_Positif	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	-1,50667 [*]	,43028	,008	-2,4989	-,5144
		Fraksi Etil Asetat	-1,94000 [*]	,43028	,002	-2,9322	-,9478
		Fraksi Air	-3,57000 [*]	,43028	,000	-4,5622	-2,5778
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	1,50667 [*]	,43028	,008	,5144	2,4989
		Fraksi Etil Asetat	-,43333	,43028	,343	-1,4256	,5589
		Fraksi Air	-2,06333 [*]	,43028	,001	-3,0556	-1,0711
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	1,94000 [*]	,43028	,002	,9478	2,9322
		Fraksi Heksana	,43333	,43028	,343	-,5589	1,4256
		Fraksi Air	-1,63000 [*]	,43028	,005	-2,6222	-,6378
	Fraksi Air	Ekstrak Etanol	3,57000 [*]	,43028	,000	2,5778	4,5622
		Fraksi Heksana	2,06333 [*]	,43028	,001	1,0711	3,0556
		Fraksi Etil Asetat	1,63000 [*]	,43028	,005	,6378	2,6222
Konsentrasi_5%	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	,66333	,16440	,004	,2842	1,0424
		Fraksi Etil Asetat	-,02333	,16440	,891	-,4024	,3558
		Fraksi Air	8,25333 [*]	,16440	,000	7,8742	8,6324
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	-,66333 [*]	,16440	,004	-1,0424	-,2842
		Fraksi Etil Asetat	-,68667 [*]	,16440	,003	-1,0658	-,3076
		Fraksi Air	7,59000 [*]	,16440	,000	7,2109	7,9691
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	,02333	,16440	,891	-,3558	,4024
		Fraksi Heksana	,68667 [*]	,16440	,003	,3076	1,0658
		Fraksi Air	8,27667 [*]	,16440	,000	7,8976	8,6558
	Fraksi Air	Ekstrak Etanol	-8,25333 [*]	,16440	,000	-8,6324	-7,8742
		Fraksi Heksana	-7,59000 [*]	,16440	,000	-7,9691	-7,2109
		Fraksi Etil Asetat	-8,27667 [*]	,16440	,000	-8,6558	-7,8976
Konsentrasi_10%	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	,72333 [*]	,24187	,017	,1656	1,2811
		Fraksi Etil Asetat	-,50000	,24187	,073	-1,0577	,0577
		Fraksi Air	8,96667 [*]	,24187	,000	8,4089	9,5244
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	-,72333 [*]	,24187	,017	-1,2811	-,1656
		Fraksi Etil Asetat	-1,22333 [*]	,24187	,001	-1,7811	-,6656
		Fraksi Air	8,24333 [*]	,24187	,000	7,6856	8,8011
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	,50000	,24187	,073	-,0577	1,0577
		Fraksi Heksana	1,22333 [*]	,24187	,001	,6656	1,7811
		Fraksi Air	9,46667 [*]	,24187	,000	8,9089	10,0244
	Fraksi Air	Ekstrak Etanol	-8,96667 [*]	,24187	,000	-9,5244	-8,4089
		Fraksi Heksana	-8,24333 [*]	,24187	,000	-8,8011	-7,6856
		Fraksi Etil Asetat	-9,46667 [*]	,24187	,000	-10,0244	-8,9089
Konsentrasi_15%	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	,42667	,43550	,356	-,5776	1,4309
		Fraksi Etil Asetat	-,79667	,43550	,105	-1,8009	,2076
		Fraksi Air	9,60333 [*]	,43550	,000	8,5991	10,6076
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	-,42667	,43550	,356	-1,4309	,5776
		Fraksi Etil Asetat	-1,22333 [*]	,43550	,023	-2,2276	-,2191
		Fraksi Air	9,17667 [*]	,43550	,000	8,1724	10,1809
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	,79667	,43550	,105	-,2076	1,8009
		Fraksi Heksana	1,22333 [*]	,43550	,023	,2191	2,2276
		Fraksi Air	10,40000 [*]	,43550	,000	9,3957	11,4043
	Fraksi Air	Ekstrak Etanol	-9,60333 [*]	,43550	,000	-10,6076	-8,5991
		Fraksi Heksana	-9,17667 [*]	,43550	,000	-10,1809	-8,1724
		Fraksi Etil Asetat	-10,40000 [*]	,43550	,000	-11,4043	-9,3957

Konsentrasi_20%	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	,40000	,33211	,263	-,3659	1,1659
		Fraksi Etil Asetat	-,67000	,33211	,078	-1,4359	,0959
		Fraksi Air	10,04333 ⁷	,33211	,000	9,2775	10,8092
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	-,40000	,33211	,263	-1,1659	,3659
		Fraksi Etil Asetat	-1,07000 ⁷	,33211	,012	-1,8359	-,3041
		Fraksi Air	9,64333 ⁷	,33211	,000	8,8775	10,4092
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	,67000	,33211	,078	-,0959	1,4359
		Fraksi Heksana	1,07000 ⁷	,33211	,012	,3041	1,8359
		Fraksi Air	10,71333 ⁷	,33211	,000	9,9475	11,4792
Fraksi Air	Ekstrak Etanol	-10,04333 ⁷	,33211	,000	-10,8092	-9,2775	
	Fraksi Heksana	-9,64333 ⁷	,33211	,000	-10,4092	-8,8775	
	Fraksi Etil Asetat	-10,71333 ⁷	,33211	,000	-11,4792	-9,9475	

Konsentrasi_25%	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	1,26667 ⁷	,39717	,013	,3508	2,1825
		Fraksi Etil Asetat	-,46333	,39717	,277	-1,3792	,4525
		Fraksi Air	11,58000 ⁷	,39717	,000	10,6641	12,4959
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	-1,26667 ⁷	,39717	,013	-2,1825	-,3508
		Fraksi Etil Asetat	-1,73000 ⁷	,39717	,002	-2,6459	-,8141
		Fraksi Air	10,31333 ⁷	,39717	,000	9,3975	11,2292
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	,46333	,39717	,277	-,4525	1,3792
		Fraksi Heksana	1,73000 ⁷	,39717	,002	,8141	2,6459
		Fraksi Air	12,04333 ⁷	,39717	,000	11,1275	12,9592
	Fraksi Air	Ekstrak Etanol	-11,58000 ⁷	,39717	,000	-12,4959	-10,6641
		Fraksi Heksana	-10,31333 ⁷	,39717	,000	-11,2292	-9,3975
		Fraksi Etil Asetat	-12,04333 ⁷	,39717	,000	-12,9592	-11,1275