



**PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL dan Uji Aktivitas
Antibakteri Terhadap *Salmonella typhimurium* Dari Ekstrak
Etanol Herba APU-APU (*Pistia stratiotes*)**

PROPOSAL

Oleh:

LILIS SAPTA EKA LESTARI

NIM 152210101017

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2019



**PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL dan UJI AKTIVITAS
ANTIBAKTERI TERHADAP *Salmonella typhimurium* DARI EKSTRAK
ETANOL HERBA APU-APU (*Pistia stratiotes*)**

SKRIPSI

**diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Sarjana Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi**

Oleh

Lilis Sapta Eka Lestari

152210101017

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2019

PERSEMBAHAN

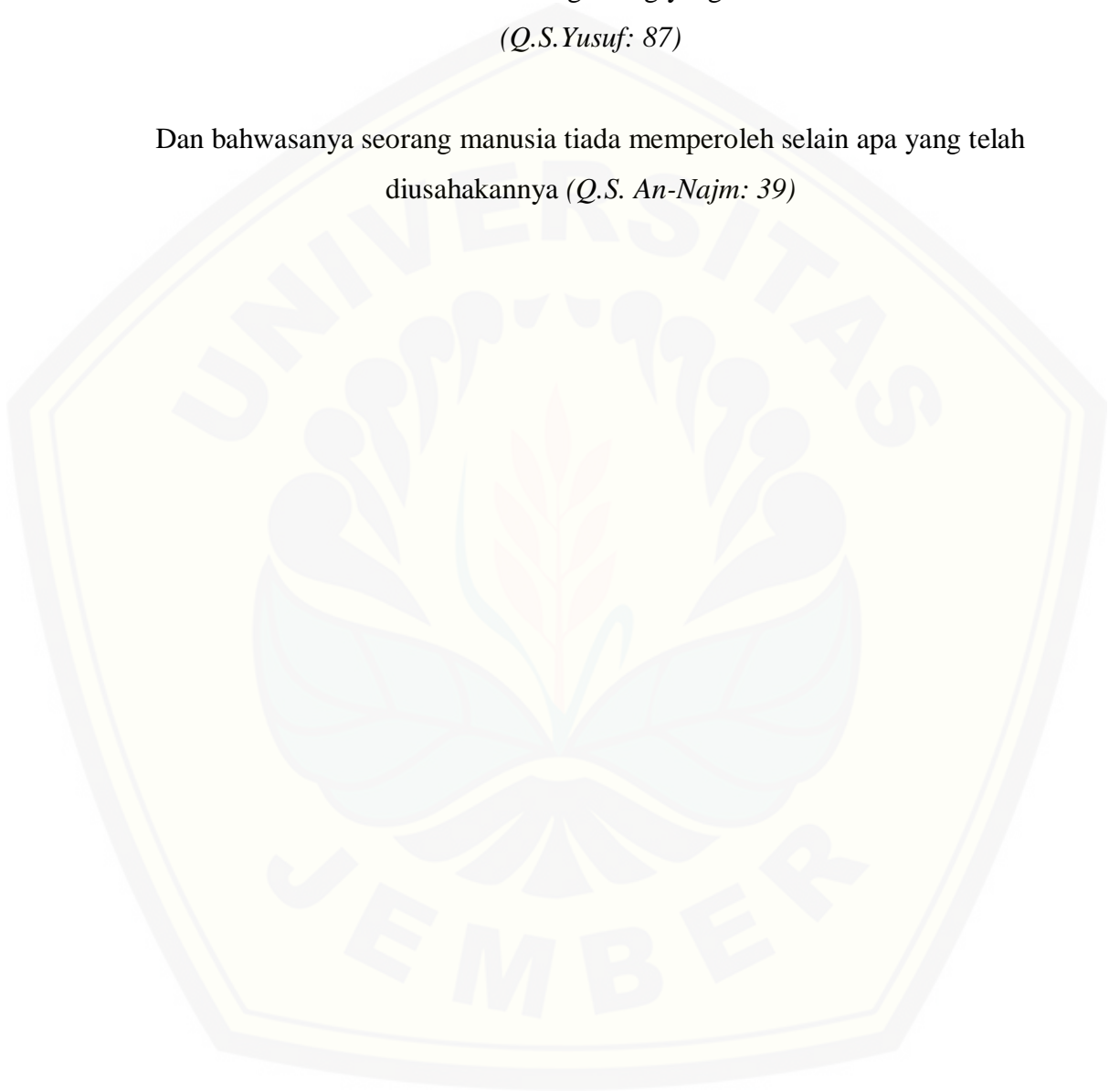
Dengan segala kerendahan hati, skripsi ini saya persembahkan sebagai bentuk tanggung jawab, bukti, dan ungkapan terimakasih kepada:

1. Tuhan Yang Maha Esa yang selalu memberikan berkat dan rahmatnya kepada penulis;
2. Ayahanda Ruhiat dan Ibunda Rummyati tercinta yang senantiasa memberikan kasih sayang, nasihat, semangat, motivasi, dan doa yang tak pernah putus untuk mengiringi setiap langkah penulis;
3. Seluruh keluarga besar yang telah memberikan motivasi, dukungan dan doa;
4. Guru-guru dari TK Bhayangkari, SD Negeri Dabasah 4, SMP Negeri 1 Bondowoso, SMA Negeri 2 Bondowoso, serta seluruh dosen pengajar Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membimbing dan memberikan ilmu yang begitu bermanfaat;
5. Teman-teman Farmasi tahun angkatan 2015 “Libitum”.

MOTTO

Janganlah kamu berputus asa dari rahmat Allah,
Sesungguhnya tiada putus asa dari rahmat Allah
melainkan orang-orang yang kufur
(*Q.S. Yusuf: 87*)

Dan bahwasanya seorang manusia tiada memperoleh selain apa yang telah
diusahakannya (*Q.S. An-Najm: 39*)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini;

Nama : Lilis Sapta Eka Lestari

NIM : 152210101017

menyatakan bahwa skripsi dengan judul “Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Salmonella typhimurium* Dari Ekstrak Etanol Herba Apu-apu (*Pistia stratiotes*)” adalah hasil tulisan saya sendiri. Dengan ini saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat keseluruhan atau sebagian tulisan orang lain yang saya ambil dengan cara menyalin atau meniru dalam bentuk rangkaian kalimat atau simbol yang menunjukkan gagasan atau pendapat atau pemikiran dari penulis lain, kecuali pengutipan substansi yang sudah saya sebutkan sumbernya.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa ada paksaan dari pihak manapun. Apabila saya melakukan tindakan yang bertentangan dengan hal tersebut di atas, baik disengaja maupun tidak, dengan ini saya menyatakan menarik skripsi yang saya ajukan sebagai hasil tulisan saya sendiri.

Jember, 19 Juli 2019

Yang menyatakan,

Lilis Sapta Eka Lestari

NIM. 152210101017

SKRIPSI

**PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL dan UJI AKTIVITAS
ANTIBAKTERI TERHADAP *Salmonella typhimurium* DARI EKSTRAK
ETANOL HERBA APU-APU (*Pistia stratiotes*)**

Oleh:

LILIS SAPTA EKA LESTARI

NIM 152210101017

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dewi dianasari, S.Si., M.Farm., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Sc., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Salmonella thypimurium* Dari Ekstrak Etanol Herba Apu-Apu (*Pistia stratiotes*)” karya Lilis Sapta Eka Lestari telah diuji dan disahkan pada:

Hari, Tanggal : Jum’at, 19 Juli 2019

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Penguji

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

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

Indah Yulia N, S.Farm., M.Farm., Apt.

NIP. 198712082014042002

NIP. 198407122008122002

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

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

Nuri, S.Si., Apt., M.Si

NIP. 198201292009121003

NIP. 196904122001121007

Mengesahkan

Dekan,

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

NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Penetapan Kadar Flavonoid dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Salmonella thypimurium* Dari Ekstrak Etanol Herba Apu-apu (*Pistia stratiotes*)” Lilis Sapta Eka Lestari, 152210101017; 2019; 50 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Infeksi masih menjadi suatu masalah serius di dunia. Penyakit infeksi yang masuk ke dalam sepuluh besar penyebab kematian terbesar adalah diare. Menurut data World Health Organization (WHO) pada tahun 2013 diare adalah pembunuh nomor dua pada balita setelah ISPA (Infeksi Saluran Pernapasan Akut). Ada beberapa faktor penyebab diare, antara lain adalah kurangnya pengetahuan dan sikap terkait diare. Faktor lain yang dapat menyebabkan diare yaitu infeksi bakteri. Salah satu bakteri penyebab diare adalah *Salmonella typhimurium*. Bakteri tersebut adalah salah satu jenis serotif dari *Salmonella enterica*. *S. typhimurium* dapat menginfeksi manusia maupun hewan. Bakteri ini dapat menghasilkan racun berupa enterotoksin dimana aktivitasnya dapat mempengaruhi usus halus, sehingga dapat menyebabkan sekresi cairan yang berlebih ke dalam rongga usus dan mengakibatkan diare. Diperlukan tata laksana yang cepat dan tepat untuk menurunkan tingkat kematian akibat diare (Depkes RI, 2011).

Dalam usaha penanggulangan penyakit infeksi oleh mikroorganisme, pengembangan obat dan pencarian sumber senyawa antiinfeksi baru dari bahan alam yang memiliki efek samping minimal perlu dilakukan untuk dapat menunjang taraf kesehatan di masyarakat. Banyak penelitian dilakukan untuk membuktikan adanya aktivitas antibakteri dari senyawa aktif tumbuhan. Salah satunya adalah tumbuhan dengan famili Araceae dari genus *Pistia* yaitu *Pistia stratiotes* atau dikenal dengan nama tumbuhan apu-apu. Apu-apu sering dimanfaatkan sebagai obat flu, demam, pegal linu, antijamur, diuretik, dan antioksidan (Thuong *et al.*, 2006).

Tumbuhan Apu-apu diduga memiliki potensi sebagai antibakteri, maka dilakukan penetapan kadar flavonoid total dan uji aktivitas antibakteri herba apu-apu terhadap *Salmonella typhimurium*. Penetapan kadar flavonoid total dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan $AlCl_3$ pada panjang gelombang 433 nm. Pengujian antibakteri ekstrak etanol herba apu-apu dilakukan dengan metode difusi cakram dengan kontrol positif kloramfenikol $30\mu\text{g}$ serta kontrol negatif DMSO 10% sekaligus sebagai pelarut.

Data hasil uji difusi cakram berupa diameter zona hambat yang diukur menggunakan jangka sorong, kemudian data dianalisis menggunakan *one way* ANOVA dan dilanjutkan dengan LSD pada taraf kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan rendemen ekstrak kental yang diperoleh 12,5% b/b dan kadar flavonoid total ekstrak etanol herba apu-apu adalah $0,353 \pm 0,060$ mg QE/g ekstrak. Hasil pengujian aktivitas antibakteri metode difusi cakram menunjukkan zona hambat pada konsentrasi 100 mg/mL sebesar $8,2 \pm 0,1$ mm, konsentrasi 200 mg/mL sebesar $9,2 \pm 0,15$ mm, konsentrasi 300 mg/mL sebesar $9,9 \pm 0,4$ mm dan konsentrasi 400 mg/mL sebesar $11,2 \pm 0,25$ mm. Hasil uji *one way* ANOVA dan LSD menunjukkan semua pasangan perlakuan ekstrak uji memiliki perbedaan yang bermakna.

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol herba apu-apu diduga terkait dengan kandungan flavonoid yang merupakan senyawa dominan dalam tumbuhan ini. Mekanisme antibakteri flavonoid adalah dengan membentuk kompleks dimana dinding sel akan berikatan dengan adhesin. Terdapat kandungan metabolit sekunder selain flavonoid yang diduga memiliki aktivitas antibakteri pada tumbuhan ini, yaitu alkaloid dengan mekanisme kerja mengganggu peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel.

PRAKATA

Alhamdulillah rabbil 'alamin, puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena dengan rahmat dan hidayah-Nyalah penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Salmonella typhimurium* Dari Ekstrak Etanol Herba ApuApu (*Pistia stratiotes*) dengan baik. Dalam penyusunan skripsi ini, banyak pihak yang telah membantu penulis. Ucapan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada Orang tua telah merawat dan membesarkan penulis dengan penuh kasih sayang serta dukungan penuh baik berupa materi, nasehat, dan do'a yang tulus sehingga memperlancar penyelesaian skripsi ini. Pada kesempatan ini penulis juga mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M. Farm., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M. Farm., Apt. selaku dosen pembimbing utama dan Ibu Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, perhatian, tenaga, dan dengan sabar membimbing penulis untuk menyelesaikan penelitian ini;
3. Bapak Bawon Triatmoko, 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.
4. Ibu Widi, Mbak Parka selaku teknisi Laboratorium Farmasi Universitas Jember yang telah membantu penulis selama penelitian;
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan berbagai pengalaman; staff dan karyawan ataaas segala bantuan yang diberikan selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi;
6. Ayahanda Ruhiat dan Ibunda Rummyati tercinta yang senantiasa memberikan kasih sayang, nasihat, semangat, motivasi, dan doa yang tak pernah putus untuk mengiringi setiap langkah penulis;

7. Sahabat terbaikku Irawati Firdiyansari dan Maulidya Barikatul Iftitah yang senantiasa mendampingi, memberikan motivasi, saran, semangat, dan mendoakan;
8. Ari Kerta Wijaya yang selalu mendukung dan memberikan semangat setiap waktu;
9. Teman-teman Farmasi tahun angkatan 2015 “Libitum”;
10. 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 kepada penulis, semoga mendapat balasan dari Allah SWT. Akhirnya dengan segala kekurangan dan keterbatasan penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Kiranya tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan tidak menutup adanya saran dan kritikan demi penyempurnaan penulisan skripsi ini.

Jember , 19 Juli 2019

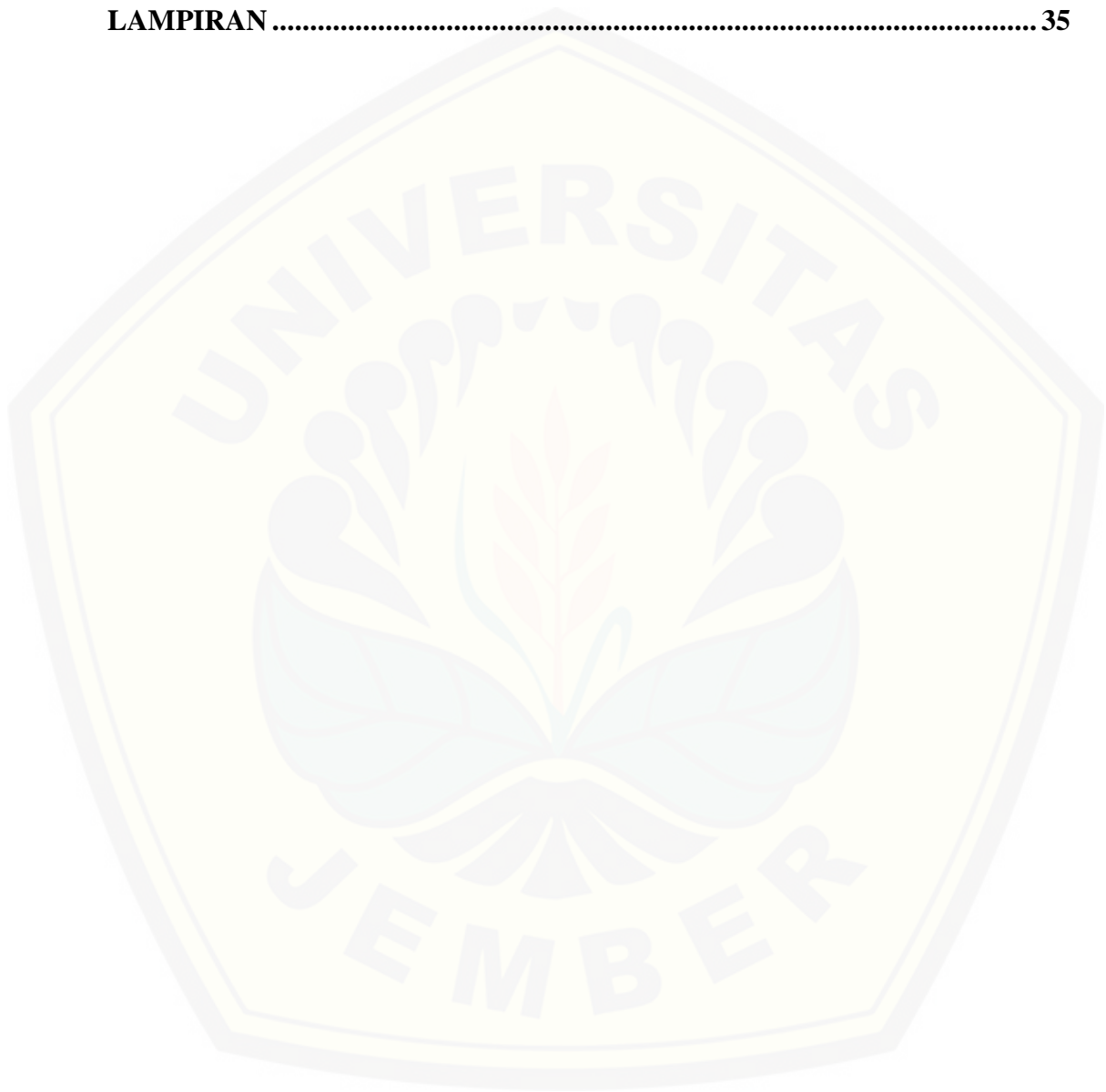
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang.....	1
1.2. Rumusan masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Tinjauan Infeksi	4
2.2. Tinjauan Antibakteri	4
2.2.1. Definisi dan Mekanisme Kerja Antibakteri.....	4
2.3. Tinjauan Tentang Salmonella typhimurium	5
2.3.1. Sistem Klasifikasi <i>S. typhimurium</i>	5
2.3.2. Karakteristik <i>S. typhimurium</i>	6
2.3.3. Patogenesis <i>S. typhimurium</i>	6
2.3.4. Pengobatan Infeksi <i>Salmonella typhimurium</i>	7
2.4. Tinjauan Tumbuhan Apu-apu.....	8
2.4.1. Morfologi Tumbuhan Apu-apu	8
2.4.2. Khasiat dan Kandungan Kimia.....	9

2.5. Flavonoid	9
2.6. Uji Aktivitas Anti bakteri.....	11
2.6.1. Metode Difusi	11
2.6.2. Metode Dilusi	12
2.6.3. Bioautografi	12
3.1. Jenis Penelitian	13
3.2. Rancangan Penelitian	13
3.3. Tempat dan Waktu Penelitian	14
3.4. Alat dan Bahan	14
3.4.1. Alat	14
3.4.2. Bahan	14
3.5. Variabel Penelitian	14
3.5.1. Variabel Bebas	14
3.5.2. Variabel Terikat	15
3.5.3. Variabel Terkendali	15
3.6. Definisi Operasional	15
3.7. Prosedur Penelitian	16
3.7.1. Determinasi Tumbuhan Apu-apu	16
3.7.2. Pembuatan Simplisia dan Serbuk Herba Apu-apu.....	16
3.7.3. Ekstraksi Maserasi	16
3.7.4. Penetapan Kadar Flavonoid.....	16
3.7.5. Uji Aktivitas Antibakteri.....	18
3.8. Analisis Data	20
3.9. Skema Penelitian	21
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
4.1. Determinasi Tumbuhan Apu-apu.....	22
4.2. Pembuatan Ekstraksi	22
4.3. Uji Aktivitas Antibakteri	23
4.4. Penetapan Kadar Flavonoid Total	26
4.4.1. Penetapan panjang gelombang maksimum	26
4.4.2. Penetapan waktu inkubasi	27

4.4.3 Penetapan kadar flavonoid total	28
BAB 5. PENUTUP	30
5.1. Kesimpulan.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31
LAMPIRAN	35



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. <i>Salmonella typhimurium</i>	6
2.2. Tumbuhan Apu-apu (<i>Pistia stratiotes</i>)	9
2.3. Kerangka Dasar Senyawa Flavonoid	10
3.1. Skema rancangan penelitian aktivitas antibakteri.....	13
3.2. Skema Penelitian	21
4.1. Tumbuhan Apu-apu	22
4.2. Hasil Uji Difusi.....	25
4.3. Absorbansi Larutan Standar	28
4.4. Absorbansi Larutan Sampel	28

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Hasil Ekstraksi Sampel	23
4.2 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri.....	24



DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

A. Hasil Determinasi Tumbuhan Apu-apu	35
B. Pembuatan Ekstrak.....	36
C. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri.....	37
D. Hasil Uji One Way ANOVA dan LSD	41
E. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin	44
F. Hasil Optimasi Waktu Inkubasi Pengujian Kadar Flavonoid	46
G. Hasil Penetapan Kadar Flavonoid Total	48
H. Perhitungan Bahan Penetapan Kadar Flavonoid Total	49

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen, seperti virus, bakteri, parasit ataupun jamur (WHO, 2016). Infeksi masih menjadi suatu masalah serius di dunia. Infeksi berada pada urutan atas penyebab penyakit dan kematian di negara berkembang termasuk Indonesia. Penyakit infeksi yang masuk ke dalam sepuluh besar terbanyak adalah diare. Menurut data *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2013 di Indonesia, diare adalah pembunuh nomor dua pada balita setelah ISPA (Infeksi Saluran Pernapasan Akut). Diare tersebar pada semua kelompok umur dengan prevalensi tertinggi terjadi pada balita umur 1-4 tahun yaitu sebanyak 16,7%. Sedangkan menurut jenis kelaminnya kasus diare pada laki-laki dan perempuan hampir sama yaitu sebanyak 8,9% pada laki-laki sedangkan pada perempuan 9,1%. Diare merupakan penyebab kematian nomor tiga pada semua kelompok usia (Kemenkes RI, 2014).

Ada beberapa faktor penyebab diare, antara lain adalah kurangnya pengetahuan dan sikap terkait diare. Faktor lain yang dapat menyebabkan diare yaitu infeksi bakteri, salah satunya bakteri *Salmonella typhimurium*. Bakteri ini merupakan salah satu serotif dari *Salmonella enterica* yaitu *typhimurium* (Edwards *et al.*, 1943). *S. typhimurium* dapat menghasilkan racun berupa enterotoksin dimana aktivitasnya dapat mempengaruhi usus halus, sehingga dapat menyebabkan sekresi cairan yang berlebih ke dalam rongga usus dan mengakibatkan diare. Diperlukan tata laksana yang cepat dan tepat untuk menurunkan tingkat kematian akibat diare (Depkes RI, 2011). Pengobatan diare akibat bakteri biasanya menggunakan antibiotik. Namun, penggunaan antibiotik terkadang memiliki efek samping yang tidak nyaman, misalnya mual, lemas, sakit kepala, dan lainnya.

Dalam usaha penanggulangan penyakit infeksi oleh mikroorganisme, pengembangan obat dan pencarian sumber senyawa antiinfeksi baru dari bahan alam yang memiliki efek samping minimal perlu dilakukan untuk dapat menunjang taraf kesehatan di masyarakat. Di Indonesia terdapat banyak

keanekaragaman hayati dan budaya, termasuk penggunaan tumbuhan sebagai bahan obat adalah bagian dari keanekaragaman tersebut (Thamrin *et al.*, 2006). Kandungan metabolit sekunder pada tumbuhan biasanya dimanfaatkan sebagai bahan obat. Senyawa aktif dari tumbuhan merupakan potensi alternatif agen antibakteri (Wagner dan Ulrich, 2009). Penelitian banyak dilakukan untuk membuktikan adanya aktivitas antibakteri dari senyawa aktif tumbuhan. Salah satunya adalah tumbuhan dengan famili Araceae dari genus Pistia yaitu *Pistia stratiotes* atau dikenal dengan nama tumbuhan apu-apu. Apu-apu sering dimanfaatkan sebagai obat flu, demam, pegal linu, antijamur, diuretik, dan antioksidan (Thuong *et al.*, 2006).

Apu-apu (*Pistia stratiotes*) merupakan tumbuhan gulma air, yang banyak mengganggu flora dan fauna air sehingga merugikan ekosistem air (Sharma, 1984). *P. stratiotes* memiliki warna daun hijau kebiruan bentuknya seperti bunga mawar, namun tidak berbatang. Tumbuhan apu-apu mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, dan glikosida. Banyak penelitian melaporkan bahwa flavonoid memiliki bioaktivitas seperti antiinflamasi, antibakteri, analgesik, antioksidan, dan antikarsinogenik. Kandungan alkaloid juga memiliki aktivitas antibakteri, sedangkan steroid pada tumbuhan berfungsi sebagai hormon, dan glikosida pada tumbuhan berupa glukosa.

Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya dari uji efektivitas ekstrak metanol daun apu-apu (*Pistia stratiotes*) sebagai antibakteri pada konsentrasi 25 mg/mL; 50 mg/mL; 75 mg/mL; dan 100 mg/mL terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* sp, *Serratia* sp, *Salmonella* sp, dan *Klebsiella* sp. dapat diketahui bahwa ekstrak metanol daun apu-apu memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan masing-masing bakteri (Abaraham, 2014). Untuk membuktikan adanya aktivitas antibakteri secara ilmiah pada herba apu-apu maka dilakukan pengujian antibakteri pada bakteri *Salmonella typhimurium* dengan menggunakan metode difusi cakram, serta penetapan kadar flavonoid total pada ekstrak herba apu-apu menggunakan spektrofotometri dengan $AlCl_3$.

1.2. Rumusan masalah

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

- a. Bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak etanol herba Apu-apu terhadap *S. typhimurium*?
- b. Berapa kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol herba Apu-apu?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini antara lain:

- a. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri dalam ekstrak etanol herba Apu-apu terhadap *S. typhimurium*.
- b. Untuk mengetahui kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol herba Apu-apu.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang ingin dicapai peneliti pada penelitian ini adalah:

- a. Hasil penelitian dapat dijadikan bahan informasi pada penggunaan tanaman Apu-apu yang sebelumnya hanya dianggap sebagai gulma namun, dapat pula digunakan sebagai sumber antibakteri baru dalam mengobati penyakit yang disebabkan oleh bakteri *S. typhimurium*.
- b. Hasil penelitian diharapkan dapat dijadikan dasar untuk penelitian berikutnya dalam pengembangan antibakteri baru dari bahan alam.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Infeksi

Mikroorganisme memiliki kemampuan menginfeksi manusia, hewan, serta tanaman. Infeksi adalah masuknya mikroorganisme patogen ke dalam tubuh dan berkembang biak. Infeksi oleh mikroorganisme bisa berdampak ringan hingga dengan kematian. Kemampuan suatu organisme patogen untuk menyebabkan infeksi dipengaruhi oleh sifat mikroba itu sendiri, serta kemampuan inangnya untuk dapat menahan infeksi (Pelczar dan Chan, 1998).

Proses infeksi terjadi melalui beberapa tahap, yakni transmisi, berikatan dengan inang, invasi untuk melewati mukosa atau membran sel, motilitas untuk mencari sumber makanan baru atau sebagai respon terhadap sinyal kemotaksis, dan penghindaran sistem imun untuk bertahan hidup dalam tubuh inang (Gillespie dan Bamford, 2012). Gangguan kesehatan akibat infeksi disebabkan oleh toksin yang dihasilkan oleh mikroorganisme patogen. Terdapat dua jenis toksin yang dihasilkan, yakni endotoksin dan eksotoksin. Endotoksin merangsang makrofag untuk memproduksi sitokin seperti interleukin-1 (IL-1) dan *tumor necrosis factor* (TNF) yang menyebabkan demam serta syok. Eksotoksin bakteri biasanya berupa protein, memiliki struktur subunit, dan dapat menyebabkan kerusakan lokal ataupun sistemik (Gillespie dan Bamford, 2012).

Tanda-tanda infeksi antara lain adalah jumlah leukosit meningkat. Leukosit yang meningkat menandakan adanya infeksi. Peningkatan nadi dan *respiratory rate* (RR) juga menandakan adanya infeksi, meskipun peningkatan RR tidak terlalu tinggi. Selain itu, diikuti pula dengan peningkatan suhu tubuh. Apabila terjadi penurunan pada jumlah leukosit menandakan bahwa adanya respon terhadap terapi antibiotik (Kemenkes RI, 2011).

2.2. Tinjauan Antibakteri

2.2.1. Definisi dan Mekanisme Kerja Antibakteri

Antibakteri merupakan obat yang digunakan untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Antibakteri dapat diartikan sebagai bahan yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme dari bakteri. Ada dua macam

aktivitas antibakteri, yaitu aktivitas bakteriostatik yang cara kerjanya hanya menghambat pertumbuhan bakteri tetapi tidak membunuh patogen dan bakterisidal yang cara kerjanya adalah membunuh patogen dalam kisaran luas (Brooks *et al.*, 2005). Bahan anti bakteri memiliki cara kerja dengan merusak dinding sel, mengubah permeabilitas dari sel, mengubah molekul protein dan asam nukleat, menghambat kerja daari enzim, dan menghambat sintesis dari asam nukleat protein (Pelczar dan Chan, 1998).

2.2.2. Kloramfenikol

Kloramfenikol adalah antibiotik yang berspektrum luas, kloramfenikol berasal dari beberapa streptomyces misalnya *S. venezuelae*, *S. phaeochromogenes* var. *chloromyces* dan *S. amiyanesis*. Kloramfenikol berupa hablur halus berbentuk jarum atau lempeng memanjang, berwarna putih hingga putih kelabu atau putih kekuningan. Kloramfenikol sukar larut dalam air, mudah larut dalam etanol, propilen glikol, dalam aseton, dan etil asetat. Kloramfenikol memiliki stabilitas yang sangat baik pada suhu kamar dan kisaran pH 2 sampai 7 stabilitas maksimumnya dicapai pada pH 6.

Cara kerja kloramfenikol dengan menghambat sintesis protein kuman. Obat ini terikat pada ribosom subunit 50s dan menghambat enzim peptidil transferase sehingga ikatan peptida tidak terbentuk pada proses sintesis protein kuman (Setiabudy, 2007). Kloramfenikol diabsorpsi dengan cepat dan hampir sempurna dari saluran cerna, karena obat ini mengalami penetrasi membran sel yang cepat. Setelah diabsorpsi kloramfenikol didistribusikan keseluruh jaringan tubuh. Metabolit utama kloramfenikol adalah *glukoronida* yang dibuat di hati dan diekskresikan melalui ginjal (Katzung, 2004). Kloramfenikol digunakan untuk pengobatan tifus, paratifus, infeksi *Salmonella* sp, *H.influenzae*, bakteri penyebab meningitis, dan pengobatan diare akibat infeksi bakteri.

2.3. Tinjauan Tentang *Salmonella typhimurium*

2.3.1. Sistem Klasifikasi *S. typhimurium*

S. typhimurium merupakan salah satu serotif dari *Salmonella enterica* yaitu *typhimurium*, bakteri ini merupakan bakteri parasit pada hewan maupun

manusia. *S. typhimurium* merupakan bakteri berbentuk basil, mesofilik, anaerob fakultatif, motil dan tidak membentuk spora. Pertumbuhannya terjadi pada suhu 4°- 37°C (optimal pada suhu 37°C) dengan pH minimum 4. Bakteri ini bersifat parasit dan patogenik bagi banyak hewan dan manusia. *S. typhimurium* menyebabkan beberapa penyakit seperti, diare, demam non-tifoid, gastro-enteritis, septikemia (keracunan darah), dan thypus abdominalis (Edwards *et al.*, 1943). Bakteri ini dapat mempengaruhi sel-sel limfoid dalam usus dan limpa yang diinfeksi saat masuk dalam aliran darah.

2.3.2. Karakteristik *S. typhimurium*

S. typhimurium merupakan bakteri berbentuk batang yang berukuran 0,7-1,5 µm x 2,0-5,0 sebagian besar dapat ditemukan di lumen usus. Bakteri ini termasuk ke dalam bakteri gram negatif memiliki lapisan luar yang tersusun dari lipopolisakarida (LPS) berfungsi sebagai endotoksin serta bergerak dengan flagel peritrik. *S.typhimurium* memiliki kemampuan untuk menjalani asetilasi antigen-O yang mengubah konformasi dan menyulitkan antibodi untuk mengenali. Suhu optimum pertumbuhan *S. typhimurium* adalah 37°C dan pada pH 6-8 (Julius, 1990). Pada media Mc Conkey membentuk koloni bulat, kecil dan transparan karena *S. typhimurium* tidak dapat memfermentasikan laktosa, diameter koloni antara 2-4 mm (James *et al.*, 2007). *S. typhimurium* dapat dilihat pada gambar 2.1



Gambar 2.1. *Salmonella typhimurium* (Sumber: Loghum, 2011)

2.3.3. Patogenesis *S. typhimurium*

Keracunan makanan akibat bakteri *Salmonella* di Amerika Serikat diperkirakan telah terjadi lebih dari 50% kasus (tahun 1969-1975). Penyakit yang disebabkan oleh *Salmonella* ini disebut juga dengan *Salmonellosis*, besarnya tingkat keracunan makanan karena *Salmonella* disebabkan bakteri ini merupakan

bakteri yang dapat tinggal disaluran cerna hewan bertulang belakang, termasuk manusia (Arisman, 2009).

Umumnya semua makanan dapat dicemari oleh bakteri *Salmonella* terutama daging, unggas, telur, maupun produk olahan dari ketiganya. Sandefur dan Paterson (1976) telah berhasil membuktikan bahwa *Salmonella* ternyata menghasilkan toksin sebanyak 7%. *S. typhimurium* dapat menghasilkan enterotoksin yang aktivitasnya dapat mempengaruhi usus halus, sehingga akan mengakibatkan sekresi cairan yang berlebih ke dalam rongga usus halus dan mengakibatkan terjadinya diare dan muntah-muntah. Selain itu bakteri ini juga menghasilkan endotoksin yang dapat menyerang sistem pertahanan tubuh dan mengakibatkan demam, peradangan dan penurunan zat besi (Arisman, 2009).

S. typhimurium bersifat infeksius pada manusia dan hewan, bakteri ini dapat masuk ke dalam tubuh melalui makanan yang terkontaminasi. Salmonellosis pada manusia dan hewan yang disebabkan oleh *S. typhimurium* ditandai dengan demam, usus akut peradangan, dan diare dalam 24 jam setelah infeksi (Fabrega dan Vila, 2013). *S. typhimurium* hampir selalu masuk melalui rute oral, namun tidak selalu akan menimbulkan infeksi dalam saluran cerna, bakteri ini akan menimbulkan infeksi apabila telah mencapai usus halus.

Faktor penting yang dapat menghalangi *S. typhimurium* mencapai usus halus adalah tingkat keasaman lambung. Apabila tingkat keasaman lambung berkurang maka makanan akan terlalu cepat melewati lambung. Hal ini akan memudahkan *S. typhimurium* untuk menginfeksi. Faktor lain yang dapat mempengaruhi infeksi bakteri ini adalah jumlah flora normal usus, dan kekebalan usus (Brooks *et al.*, 2008).

2.3.4. Pengobatan Infeksi *Salmonella typhimurium*

Terapi antibakteri yang diakibatkan oleh infeksi *Salmonella* adalah dengan menggunakan antibiotik seperti, ampisilin, trimetoprim-sulfametoksazol, atau sefalosporin generasi ketiga. Namun, adanya resistensi yang terjadi terhadap penggunaan banyak obat yang ditransmisikan secara genetik oleh plasmid berbagai bakteri enterik merupakan masalah pada infeksi *Salmonella*. Perlu dilakukan pemeriksaan penunjang seperti uji sensitivitas untuk memilih antibiotik

yang. Menurut WHO, di negara-negara maju antibiotik yang sering digunakan sebagai pengobatan optimal adalah golongan fluoroquinolon. Golongan obat ini dapat ditoleransi baik oleh tubuh, diabsorpsi dengan baik secara oral, kerjanya lebih cepat dan efektif daripada kloramfenikol.

Di Indonesia, pilihan utama dalam pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *Salmonella* masih menggunakan kloramfenikol. Penderita infeksi biasanya diberikan terapi kloramfenikol secara oral, dan terapi intravena sebagai permulaan diberikan pada pasien yang menderita penyakit yang lebih berat dengan gejala anoreksia, distensi abdominal, dan muntah. Pengobatan diberikan dalam waktu 14 hari untuk mencegah terjadinya relaps (Brooks *et al.*, 2008).

2.4. Tinjauan Tumbuhan Apu-apu

Klasifikasi tumbuhan Apu-apu

Klasifikasi tumbuhan Apu-apu adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Filum	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Arales
Famili	: Araceae
Genus	: Pistia
Spesies	: <i>Pistia stratiotes</i> L.
Sinonim	: Ki Ambang, Pengambangan, Tayapu (Kalimantan), Apu-Apu, Kapu-Kapu (Sumatra), Ki Apu, Apon-Apon, Kanjeng, Apu, Kayu Apu, Peyape, Kapu-Kapu (Jawa) (Thamrin, 2010).

2.4.1. Morfologi Tumbuhan Apu-apu

Tumbuhan apu-apu adalah tumbuhan air yang hidup terapung di dalam air. Tumbuhan ini dapat ditemukan di daerah seperti, sungai, sawah dan rawa yang berair tawar. Habitat apu-apu ini berada pada ketinggian 5-8000 m dari permukaan laut. Tumbuhan apu-apu ini berukuran 5 sampai 10 cm. Apu-apu memiliki daun tunggal berbentuk roset. Helaian daun apu-apu tebal, berongga

seperti spon dengan ujung daun yang bulat dan bergelombang. Tulang daun tumbuhan apu-apu sejajar, permukaannya berbulu halus. Daun apu-apu berwarna hijau cerah, panjangnya 1,3-10 cm dengan lebar 1,5-6 cm. Tumbuhan apu-apu berkembang biak dengan cara tunas, kemudian memisahkan diri (Kirtikar KK, 2001).



Gambar 2.2. Tumbuhan Apu-apu (*Pistia stratiotes*)

(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2019)

2.4.2. Khasiat dan Kandungan Kimia

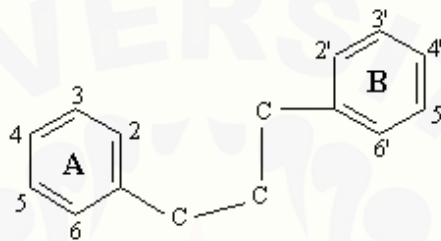
Tumbuhan apu-apu mengandung senyawa flavonoid, steroid, glikosida dan alkaloid (Ahad *et al.*, 2011). Tumbuhan apu-apu memiliki rasa pedas dan bersifat sejuk. Tumbuhan apu-apu berkhasiat untuk obat penyakit rematik, obat anti radang, bermanfaat sebagai peluruh keringat (diaforetik), diuretik (Pallavi *et al.*, 2011), digunakan untuk obat penyakit flu, demam (Kumar *et al.*, 2011), batuk rejan, penyakit pegal linu, obat bengkak akibat terbentur (memar), edema, disuria, ultikaria, pengobatan penyakit gatal (pruritus), bronkodilator (Achola *et al.*, 1997), antitumor (Fatope *et al.*, 1993), antijamur, *P.stratites* juga berfungsi sebagai antioksidan (Thuong *et al.*, 2006).

2.5. Flavonoid

Senyawa flavonoid merupakan senyawa fenolik yang paling banyak ditemukan dalam tumbuhan, terdapat di beberapa bagian tanaman terutama pada sel tanaman yang mengalami fotosintesis (Kumar dan Pandey, 2013). Flavonoid umumnya ditemukan pada tumbuhan dalam bentuk glikosida dan memberikan warna biru, merah, dan oranye pada daun, bunga, dan buah. Flavonoid terbentuk

pada tumbuhan dari asam amino aromatik fenilalanin, tirosin, dan malonat (Pietta, 2000).

Struktur dasar flavonoid adalah 15 atom karbon yang terdiri dari dua cincin benzena, yakni cincin A dan B (Gambar 2.3) yang terhubung melalui cincin piran (C). Flavonoid dapat dibagi menjadi beberapa golongan seperti flavon, apigenin, dan luteolin), flavonol (kuersetin, kaemferol, *myricetin*, dan fisetin), flavonon (flavon, hesperetin, dan naringenin) dan lainnya (Middleton, 1998).



Gambar 2.3 Kerangka dasar senyawa flavonoid (Sumber: Middleton, 1998).

Dalam pengobatan tradisional, tumbuhan dengan kandungan flavonoid banyak digunakan. Karena, flavonoid memiliki berbagai macam aktivitas terhadap macam-macam organisme. Flavonoid yang merupakan senyawa fenol dapat bersifat koagulator protein (Dwijoseputro, 1994). Protein yang menggumpal tidak akan dapat berfungsi lagi, sehingga akan mengganggu pembentukan dinding sel bakteri. Pada konsentrasi yang biasa digunakan (larutan dalam air 1-2%), fenol dan derivatnya menimbulkan denaturasi protein (Jawetz *et al.*, 2001). Penelitian farmakologi terhadap senyawa flavonoid menunjukkan bahwa beberapa senyawa golongan flavonoid memperlihatkan aktivitas seperti antifungi, diuretik, antihistamin, antihipertensi, insektisida, bakterisida, antivirus dan menghambat kerja enzim (Geissman, 1962).

Flavonoid adalah kandungan khas yang dimiliki tumbuhan hijau dan sering dijadikan bahan penelitian penemuan obat baru di Indonesia (Markham, 1988). Tumbuhan apu-apu mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, dan glikosida (Ahad *et al.*, 2011). Berdasarkan uraian dan kandungan dari tumbuhan apu-apu, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengidentifikasi flavonoid dari herba apu-apu yang diduga memberikan efek antibakteri.

2.6. Uji Aktivitas Antibakteri

Metode uji aktivitas antibakteri antara lain secara garis besar terbagi menjadi tiga yaitu difusi, dilusi dan bioautografi (Cos *et al.*, 2006). Berikut beberapa penjelasan mengenai metode uji aktivitas antibakteri.

2.6.1. Metode Difusi

Pada metode difusi, senyawa uji pada konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam media yang telah diinokulasi dengan bakteri, kemudian diukur zona hambat pada akhir inkubasi. Hasil inokulasi disimpan pada suhu yang lebih rendah selama beberapa jam agar meningkatkan difusi dan diameter zona hambat (Cos *et al.*, 2006). Berikut macam-macam metode difusi dibedakan menjadi beberapa macam, yaitu:

a. Metode difusi cakram

Pengujian difusi cakram ini menggunakan kertas cakram yang dimasukkan ke dalam media padat yang berisi kultur bakteri (Filho dan Cordeiro, 2014). Agen antibakteri berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan bakteri (Balouiri *et al.*, 2016). Pengujian ini untuk mendeteksi sensitivitas atau resistensi bakteri patogen fakultatif aerob dan anaerob (Filho dan Cordeiro, 2014).

b. Metode difusi sumuran

Metode difusi sumuran secara umum digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri dari ekstrak tumbuhan. Prosedur yang digunakan sama dengan metode difusi cakram, permukaan atas agar media padat diinokulasi dengan menggoreskan okulum bakteri. Selanjutnya, dibuat lubang dengan diameter 6-10 mm secara aseptik menggunakan jarum ose steril. Kemudian ditambahkan agen antibakteri atau larutan ekstrak pada konsentrasi yang diinginkan dengan volume (20-100 μ L) ke dalam sumur. Kemudian cawan agar diinkubasi dalam kondisi yang dengan mikroorganisme uji. Agen antibakteri akan berdifusi dalam media agar dan menghambat pertumbuhan bakteri yang diuji (Baloiri *et al.*, 2016).

c. Metode *agar plug diffusion*

Metode *agar plug diffusion* sering digunakan untuk membedakan mikroorganisme. Metode ini sama dengan metode cakram, strain bakteri

dibiakkan pada media yang sesuai dengan menggoreskan pada permukaan cawan. Selama pertumbuhan, bakteri mensekresikan molekul yang dapat berdifusi dalam media agar. Setelah diinkubasi, sebuah media agar silinder dipotong secara aseptis dengan *cork borer steril* dan diendapkan pada permukaan agar dari cawan lain yang sebelumnya diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Zat berdifusi pada media agar. Kemudian aktivitas antibakteri dari molekul bakteri yang disekresi akan terdeteksi dengan adanya zona hambat pada sekitar *agar plug* (Baloiri *et. al* 2016).

2.6.2. Metode Dilusi

Keuntungan utama dari penggunaan metode dilusi adalah dapat memperkirakan konsentrasi senyawa uji yang ada pada medium agar atau suspensi broth, biasanya digunakan untuk penentuan nilai KHM. Pada metode dilusi agar, medium diinokulasi dengan organisme uji dan sampel yang akan diuji dicampur dengan inokulum. Nantinya kultur kontrol yang tidak mengandung sampel uji dapat dibandingkan dengan material yang diinokulasi untuk membandingkan pertumbuhan bakteri. Dilakukan pengulangan pada pengujian dengan variasi dilusi sampel uji dalam medium kultur dan menentukan dilusi yang paling tinggi yang dapat mencegah pertumbuhan mikroorganisme sampel (Rahman, *et al.*, 2005). Berbagai konsentrasi senyawa uji dicampur dengan suspensi bakteri pada beberapa tabung dalam tabung uji. Konsentrasi terendah menyebabkan penghambatan pertumbuhan mikroorganisme sesuai dengan nilai KHM. Pada uji mikrodilusi cair, mikroorganisme yang tumbuh di sumur plat, dimana berbagai konsentrasi senyawa uji ditambahkan. Kekeruhan dalam sumur menunjukkan adanya pertumbuhan mikroorganisme (Choma, 2010).

2.6.3. Bioautografi

Bioautografi merupakan metode pendeteksian yang digunakan untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisir aktivitas antimikroba tersebut pada kromatogram. Metode ini memanfaatkan pengerjaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Akhyar, 2010).

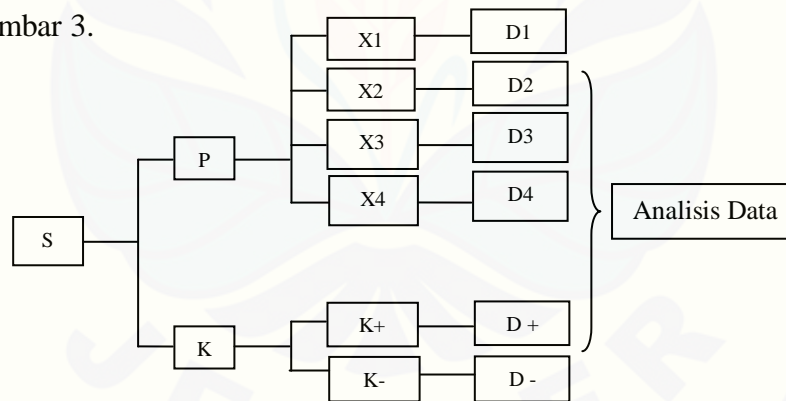
BAB III. METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Uji Aktivitas Antimikroba Terhadap *S. typhimurium*. Dari Ekstrak Etanol Herba Apu-apu ini merupakan penelitian *true experimental laboratories*.

3.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan adalah *the post test control only group design*. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol herba apu-apu dilakukan dengan menggunakan metode cakram. Rancangan penelitian pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol herba apu-apu ini terbagi atas kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Aktivitas antibakteri pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan untuk metode difusi cakram ditunjukkan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Rancangan penelitian pengujian aktivitas antibakteri ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian aktivitas antibakteri

Keterangan:

S = Sampel

P = Kelompok perlakuan

K = Kelompok kontrol

K+ = Kontrol positif (Kloramfenikol
30 µg)

K- = Kontrol negatif (DMSO steril
10%)

D+ = Hasil data kontrol positif

D- = Hasil data kontrol negatif

X1-X4 = Konsentrasi larutan sampel
(100 mg/mL, 200 mg/mL,
300 mg/mL, dan 400 mg/mL)

D1-D4 = Hasil data larutan uji

3.3. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Jember mulai bulan April - Juni 2019.

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik (Sartorius CP224S), blander, oven (Memmert), serangkaian *rotary evaporator* (Heidolph), seperangkat alat gelas, spatula logam, pinset, rak tabung reaksi, jarum ose, *hot plate*, bunsen, *microtip*, *microtube*, vortex (Labnet), aluminium foil (Klin-pak), kertas saring, *waterbath*, autoklaf (ALP), *micropipet* (SOCOREX ASBA S.A), *swab*, jangka sorong, *laminar air flow* (Airtech) dan inkubator (Gallenkamp).

3.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba tanaman apu-apu yang dikeringkan menjadi simplisia. Bahan kimia yang digunakan untuk penetapan kadar flavonoid total diantaranya adalah etanol 96%, kuersetin, $AlCl_3$, CH_3COOK .

Bahan kimia yang digunakan untuk uji antibakteri adalah akuades steril (Otsuka), NaCl fisiologis (Widatra), DMSO (Dimetil sulfoksida) (Emsure). Bakteri uji yang digunakan adalah *S.thyphimurium*. Media bakteri yang digunakan untuk peremajaan adalah biakan murni adalah Nutrient Agar (Merck). Media bakteri yang digunakan pada metode difusi (cakram) adalah Mueller Hinton Agar (MHA) (Himedia). Zat pembanding anti bakteri yang digunakan sebagai kontrol positif pada percobaan ini adalah kloramfenikol 30 μ g.

3.5. Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian aktivitas antibakteri metode difusi (cakram) adalah ekstrak etanol herba apu-apu (*Pistia statiotes*) dalam empat konsentrasi yaitu 100 mg/mL, 200 mg/mL, 300 mg/mL, dan 400 mg/mL.

3.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat penetapan kadar flavonoid total adalah kadar flavonoid. Variabel terikat pada penelitian uji antibakteri metode difusi cakram adalah nilai diameter zona hambat ekstrak etanol herba apu-apu terhadap *S. typhimurium* pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) setelah inkubasi selama 21 jam dalam satuan mm (milimeter).

3.5.3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah herba apu-apu diekstraksi menggunakan metode ekstraksi maserasi (remaserasi), media *Nutrient Agar Slant* (NAS) untuk peremajaan bakteri, media *Mueller Hinton Agar* (MHA) untuk uji antibakteri difusi cakram.

3.6. Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Apu-apu pada penelitian ini adalah seluruh bagian tumbuhan yang dikumpulkan secara acak dari tumbuhan apu-apu yang diperoleh dari wilayah kecamatan Ambulu, pada bulan April 2019.
- b. Bakteri yang digunakan sebagai bakteri uji adalah *S. typhimurium* yang didapat dari Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- c. Daya hambat ekstrak herba *Pistia stratiotes* adalah kemampuan ekstrak etanol herba *P. stratiotes* menghambat pertumbuhan bakteri. Daya hambat dinyatakan sebagai diameter zona hambat. Diameter hambatan diukur berdasarkan zona bening disekitar cakram dengan menggunakan jangka sorong.
- d. Penetapan kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol herba apu-apu dilakukan menggunakan metode spektrofotometri.

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. Determinasi Tumbuhan Apu-apu

Semua bagian tumbuhan apu-apu dideterminasi di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember untuk memastikan bahwa tumbuhan yang diuji merupakan spesies *Pistia stratiotes*.

3.7.2. Pembuatan Simplisia dan Serbuk Herba Apu-apu

Herba apu-apu disortasi basah terlebih dahulu, lalu dicuci hingga bersih menggunakan air lalu ditiriskan, setelah itu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, dilakukan sortasi kering untuk memisahkan antara pengotor dan bagian yang tidak diinginkan, sehingga dihasilkan simplisia herba apu-apu. Simplisia herba apu-apu selanjutnya diserbuk menggunakan alat penggilingan hingga halus.

3.7.3. Ekstraksi Maserasi

Serbuk simplisia herba apu-apu ditimbang sejumlah 195 gram, lalu dimasukkan ke dalam maserator, kemudian ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan (1: 10). Serbuk herba apu-apu direndam dalam pelarut etanol selama 3 hari dengan pengadukan setiap 24 jam, kemudian disaring menggunakan corong buchner. Filtrat yang didapatkan dipekatkan dengan menggunakan *rotavapour* pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm. Pelarut etanol hasil *rotavapour* digunakan kembali untuk remaserasi selama 3 hari dengan pengadukan setiap 24 jam kemudian disaring menggunakan corong *buchner*. Filtrat yang didapatkan dipekatkan dengan menggunakan *rotavapour* pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm. Ekstrak kental yang diperoleh diambil dan dituang ke dalam vial. Rendemen ekstrak etanol herba apu-apu yang didapatkan dihitung dan disimpan dalam lemari pendingin.

3.7.4. Penetapan Kadar Flavonoid

Metode penentuan kadar flavonoid menggunakan metode $AlCl_3$ (Woisky dan Salatino, 1998).

a. Pembuatan Larutan Standar Flavonoid

Dibuat larutan induk dengan menimbang 20 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 10 ml. sehingga diperoleh konsentrasi 2000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan 2000

$\mu\text{g/mL}$ diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, dan 140 $\mu\text{g/mL}$.

a. Penentuan Panjang Gelombang

Larutan standar dipipet sebanyak 0,5 mL dan direaksikan dengan 1,5 mL etanol, 1 mL reagen AlCl_3 (10% v/v akuades), 1 mL CH_3COOK dan 2,8 mL akuades. Dipilih salah satu larutan standar untuk *scanning* panjang gelombang dan dilihat spektranya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi terbesar menunjukkan titik puncak spektra dan digunakan sebagai panjang gelombang maksimum yang terpilih.

b. Penetapan Waktu Inkubasi

Larutan standar kuersetin dipipet sebanyak 0,5 mL dan direaksikan dengan 1,5 mL etanol, 1 mL reagen AlCl_3 (10% v/v akuades), 1 mL CH_3COOK dan 2,8 mL akuades. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 433 nm dengan spektrofotometer UV-Vis mulai menit ke-0 sampai ke-60 dengan selang waktu 5 menit.

c. Pembuatan Larutan Sampel

Ekstrak etanol herba apu- apu ditimbang sebanyak 50 mg dan direplikasi tiga kali. Kemudian ekstrak yang telah ditimbang dilarutkan dengan etanol 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 5000 $\mu\text{g/mL}$.

d. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Larutan standar dipipet 0,5 mL dan direaksikan dengan 1,5 mL etanol, 1 mL reagen AlCl_3 (10% v/v akuades), 1 mL CH_3COOK , dan 2,8 mL akuades kemudian didiamkan selama 25 menit dalam kuvet. Selanjutnya, larutan diukur absorbansinya dengan menggunakan panjang gelombang 433 nm.

e. Pengujian flavonoid

Larutan sampel dipipet 0,5 mL, lalu direaksikan dengan 1,5 mL etanol, 1 mL reagen AlCl_3 (10% v/v akuades), 1 mL CH_3COOK dan 2,8 mL akuades kemudian didiamkan selama 25 menit dalam kuvet. Selanjutnya, larutan diukur absorbansinya dengan menggunakan panjang gelombang 433 nm. Kadar flavonoid dinyatakan dalam mg QE (ekuivalensi kuersetin) dalam 1 gram ekstrak.

3.7.5. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi alat dan bahan

Alat yang akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri disterilisasi dengan dicuci bersih, dikeringkan, dan dibungkus satu per satu dengan menggunakan kertas kayu kemudian dilakukan proses sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Ose disrerilkan dengan pemijaran. Alat-alat yang tidak tahan panas disterilkan menggunakan alkohol.

b. Penyiapan media

Pembuatan media *Muller Hinton Agar* (MHA) dilakukan dengan menimbang 1,7 gram *Muller Hinton Agar* (MHA), kemudian dilarutkan dalam 45 mL akuades. Dicampurkan dan dilarutkan dengan pemanasan dan pengadukan. Campuran dididihkan selama satu menit hingga larut sempurna. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Larutan media dituang ke dalam 3 cawan petri steril masing-masing dengan volume 15 mL, kemudian didiamkan hingga memadat.

c. Peremajaan Biakan Murni

Biakan murni bakteri diremajakan pada NAS (*Nutrient Agar Slant*) dalam tabung reaksi dengan cara mengambil *S. thypimurium* menggunakan jarum ose steril, kemudian jarum ose digoreskan pada NAS. Proses tersebut dilakukan secara aseptis yaitu dengan mendekatkan mulut tabung reaksi pada nyala api saat menggorekan jarum ose. Kemudian, media dalam tabung reaksi ditutup rapat dengan menggunakan kapas dan plasatik *wrap*, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C.

d. Pembuatan standar McFarland 0,5

BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dicampur dengan 9,95 mL H₂SO₄ 1%, sehingga setara dengan 1 x 10⁸ CFU/ml, kemudian divortex hingga homogen. Periksa densitas Mc Farland dengan mengukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer (CLSI, 2012). Absorbansi diukur pada panjang gelombang 625 nm pada rentang 0,08-0,13 (Damayanti, 2018).

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *S. thypimurium* dari kultur peremajaan biakan murni diambil menggunakan jarum ose steril, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL NaCl 0,9% secara aseptis lalu divortex. Kekeruhan suspensi bakteri diperiksa menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm. Suspensi bakteri berfungsi sebagai biakan aktif.

f. Pembuatan kontrol negatif dan kontrol positif

1. Kontrol negatif

Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 10% (Amalia *et al.*, 2014)

2. Kontrol positif

Kontrol positif yang digunakan adalah cakram kloramfenikol 30 μ g.

g. Pembuatan larutan uji

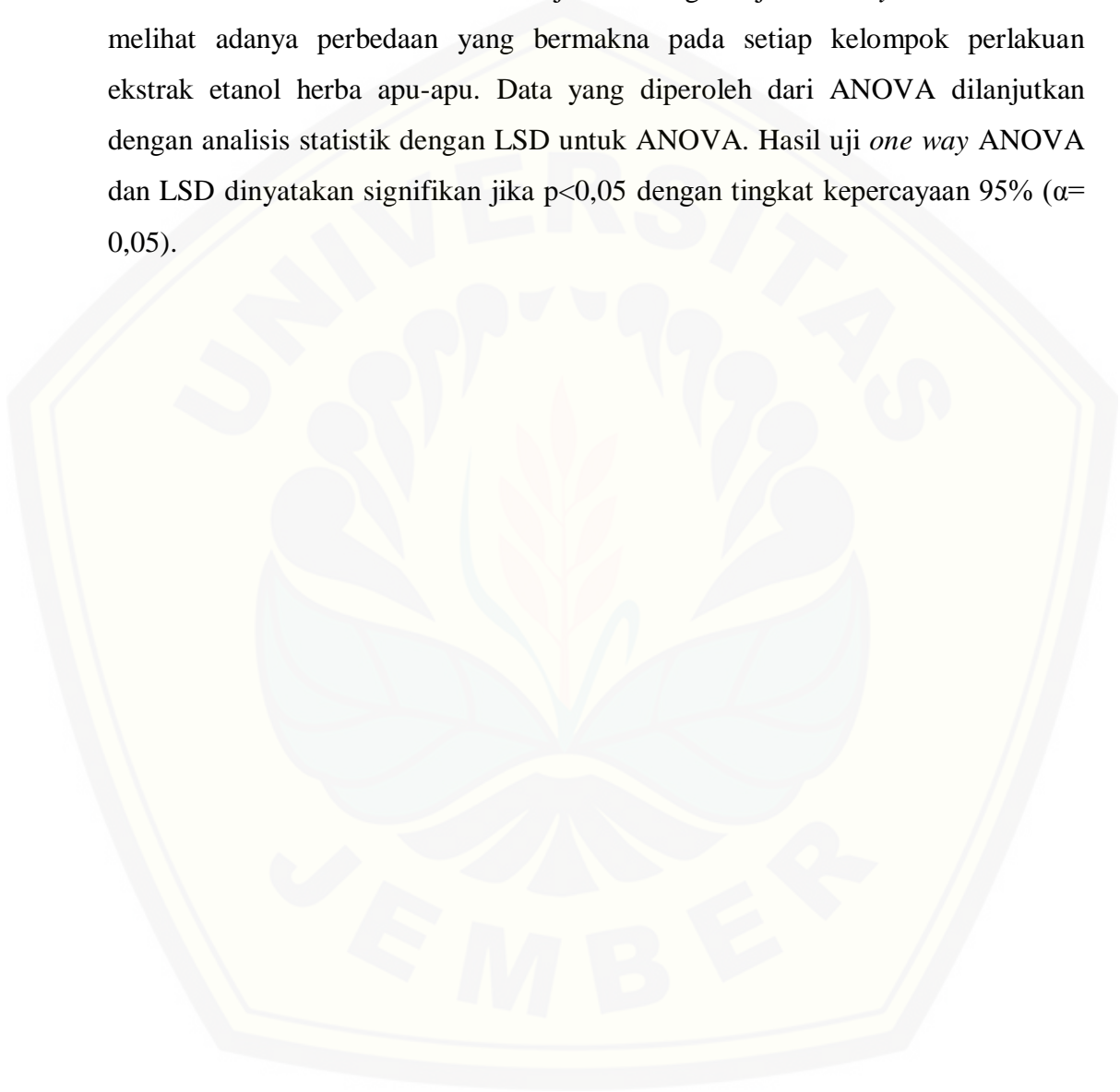
Uji aktivitas antibakteri metode difusi cakram dilakukan menggunakan lima konsentrasi ekstrak etanol herba apu-apu yaitu 100 mg/mL, 200 mg/mL, 300 mg/mL dan 400 mg/mL.

h. Uji aktivitas antibakteri metode difusi cakram

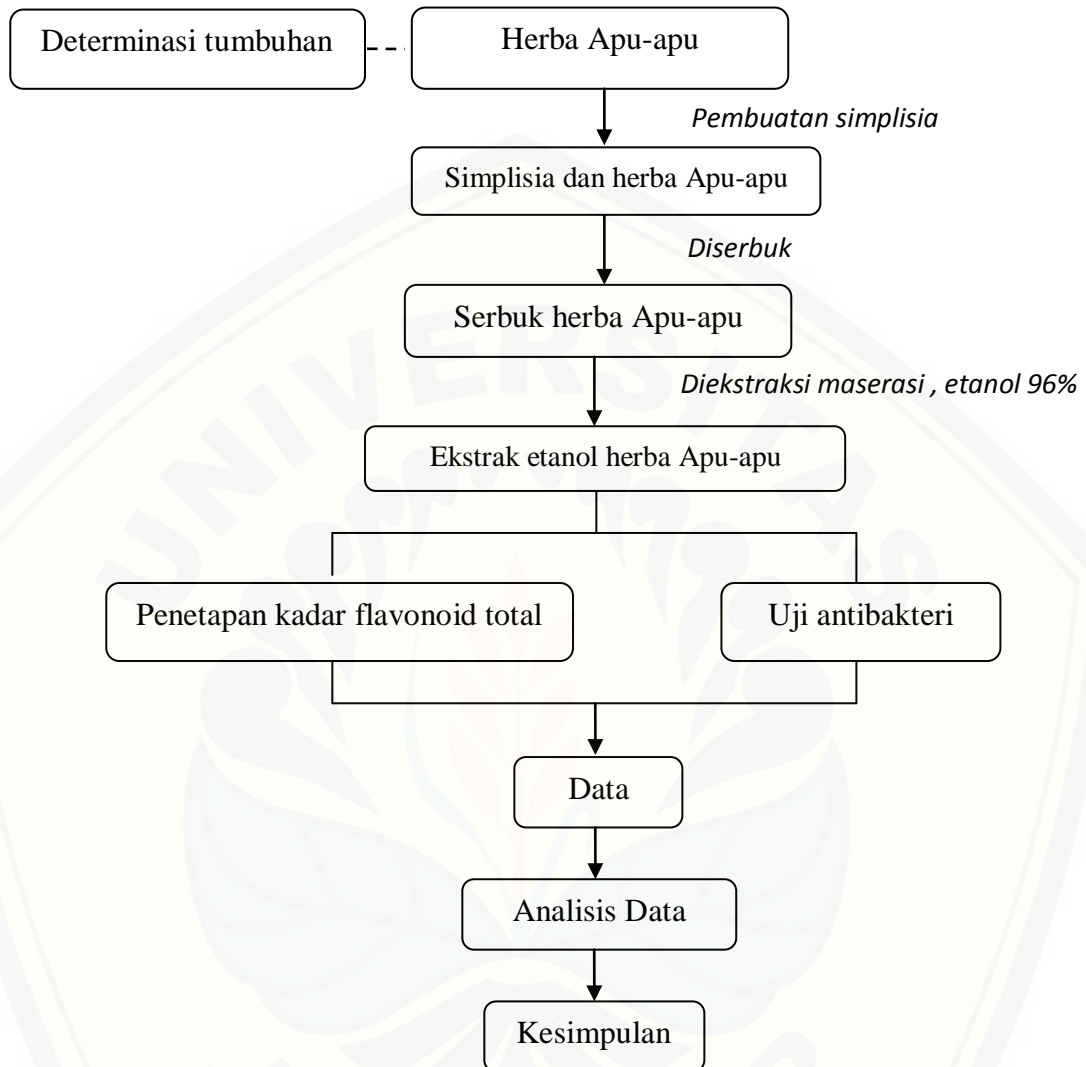
Sebanyak 1 ml suspensi bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri steril, selanjutnya ditambahkan dengan 15 ml *Nutrient agar* cair. Cawan petri digoyangkan berlawanan dengan arah jarum jam sebanyak 5-10x dan digoyangkan lagi searah jarum jam sebanyak 5-10x agar media, setelah agar memadat suspensi bakte sebanyak 1 ml dituang kedalam agar hingga tercampur merata dipermukaan agar. Pembuatan media dilakukan di dekat api bunsen dalam *Laminar Air Flow*. Tiap cawan petri dibagi menjadi 6 bagian. Kertas cakram kontrol positif, kontrol negatif dan cakram yang telah dijenuhkan dengan larutan ekstrak diletakkan pada masing-masing bagian dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Nufailah, 2008). Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali untuk uji aktivitas antibakteri ini. Adanya area jernih di sekeliling cakram menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri, kemudian area jernih tersebut diukur diameternya menggunakan jangka sorong.

3.8. Analisis Data

Data hasil diameter zona hambat uji antibakteri metode cakram diuji homogenitas dan normalitas terlebih dahulu. Bila data yang dihasilkan homogen dan terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *one way ANOVA* untuk melihat adanya perbedaan yang bermakna pada setiap kelompok perlakuan ekstrak etanol herba apu-apu. Data yang diperoleh dari ANOVA dilanjutkan dengan analisis statistik dengan LSD untuk ANOVA. Hasil uji *one way ANOVA* dan LSD dinyatakan signifikan jika $p < 0,05$ dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).



3.9. Skema Penelitian



Gambar 3.2. Skema penelitian

BAB 5. PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol herba apu-apu memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhimurium* yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat pada metode difusi cakram pada konsentrasi 100 mg/mL sebesar $8,2 \pm 0,1$ mm; 200 mg/mL sebesar $9,2 \pm 0,15$ mm ; 300 mg/mL sebesar $9,9 \pm 0,4$ mm dan 400 mg/mL sebesar $11,2 \pm 0,15$ mm.
2. Kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% herba apu-apu yaitu sebesar $0,353 \pm 0,060$ mg QE/g ekstrak.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka saran yang dapat disampaikan dalam penelitian ini meliputi sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap senyawa aktif lain seperti alkaloid pada ekstrak herba apu-apu yang berpotensi terhadap aktivitas antibakteri.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memisahkan senyawa bioaktif yang spesifik memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. typhimurium*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, Jayanti, Pritha, C., Khare, K. 2014. Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of Pistia stratiotes Leaves. *Research Article*.
- Achola, K., J., A.A. Indalo and R.W. Munenge. 1997. Pharmacological activities of Pistia stratiotes. *Int. J. Pharmacogn.*, 35:329.
- Akhyar, 2010. *Uji Daya Hambat dan Analisis KLT Bioautografi Ekstrak Akar dan Daun Buah Bakau (Rhizophora stylosa Griff) terhadap Vibrio harvey*. Skripsi. Makasar: Universitas Hasanudin.
- Amalia, S., Wahdaningsih, S. and Untari, E.K., 2014. Antibacterial activity testing of n-hexane fraction of red dragon (*Hylocereus polyrhizus britton and rose*) fruit peel on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Traditional Medical Journal*, 19, pp.89-95.
- AOAC. (1998). *Peer-Verified Methods Program Manual on Policies and Procedures*. USA: Arlington, Virginia.
- Arisman. 2009. *Gizi dalam Daur Kehidupan*. Jakarta: EGC.
- Balouiri, M., M. Sadiki, dan S. K. Ibsouda. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2): 71-79.
- Brooks GF., Butel JS dan Morse SA. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan Mudihardi E, Kuntaman, Wasito EB. Jakarta: Salemba Medika, 317-27.
- Cos, P., A. J. Vlietinck, D. Vanden, dan L. Maes. 2006. *Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro "proof-of-concept"*. 106: 290-302.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in proliis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (3), p. 178-182.
- Choma, Irena M, Edyta M Grzelak. 2010. Bioautography Detection in Thin-Layer Chromatography. *Journal of Chromatography A Chroma-351708*.
- CLSI. 2015. *M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.


- Cowan, M.M. 1999. Plant Product as Antimicrobial Agent. *Clinical Microbiology Reviews*.12: 564-582.
- Cullimore, D.R. 2000. *Partical Atlas for Bacterial Identification*. Boca Raton: CRC Lewis Publishers.
- Cushine, T.P.T., dan A.J. Lamb. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 343-356.
- Damayanti, D. D. 2018. Skiring Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Epifit Liken *Parmelia dilatata Vain*. Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Departemen Kesehatan RI. 1991. *Petunjuk Pemeriksaan Mikrobiologi Makanan dan Minuman*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan
- Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen kesehatan Republik Indonesia.
- Edwards, P.R., and D. W. Bruner. 1943. The occurrence and distribution of *Salmonella* types in the United State. *J. Infect. Dis.* 72:58-67.
- Ewald, C., Modig, S. F., Johansson, K., Sjöholm, I. and Akesson, B. (1999). Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry*, 64, p.231-235.
- Fatmasari, 2015, Uji Sensitivitas Antibiotik Kloramfenikol, Siprofloksasin, Eritromisin, dan Klindamisin terhadap *Bacillus cereus* yang Diisolasi dari Daging Sapi di Pasar Tradisional dan Pasar Modern Kota Makassar, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Hasanuddin Makassar, Makassar.
- Fatope, M.O., H. Ibrahim and Y. Takeda. 1993. Screening of higher plants reputed as pesticides using Brine shrimp lethality assay. *Int. J. of Pharmacognosy*, 31: 250-254.
- Gandjar, I. G. & Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gillespie, S. dan K. Bamford. 2012. *Microbiology and Infection at a Glance*. Edisi 4. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd.
- Greenwood. 1995. *Antibiotics, Susceptibility (Sensitivity) Test Antimicrobial And Chemoterapy*. Mc. Graw Hill Company, USA.

- Gupta, C., Grag A., Uniyal R., Kumari A. 2009. Antimicrobial activity of some herbal oils againts common food-borne pathogen. *Journal of Microbiolog research*, Vol (2), p. 258-261.
- Harborne, J. (1987). *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB Press.
- Hermawan A., 2007, Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (Piper betle L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Disk, *Artikel Ilmiah*, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- James, M. dan J. Mahan. 2007. *Microbiology and Molecular Genetics*. American: John Mekalanos.
- Katzung, B.G. 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kemenkes RI. 2011. *Pedoman Interpretasi Data Klinik*. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kumar, H.K.S., M.B.V. Raju, S.C. Dinda, S. K. Sahu and M. Banerjee. 2011. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activity of *Pistia stratiotes* L. *Rasayan J. Chem.*, 4(3): 506-511.
- Kirtikar, K.K. and B.D. Basu. 2001. The indian medicinal plants. Dehradum: *Oriental Enterprises*. Pp. 3576-3579.
- Markham, K.H., 1998. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. (Edisi 2). Penerjemah: K. Padmaewinata dan I. Soediro. Bandung: Penerbit ITB.
- Middleton, E.J. (1998). *Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 439, p. 175-182.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*, 26 (2), p.211-219.
- Pallavi, T., S. Arora, R. Gupta and P. Mali. 2011. Diuretic activity of *Pistia stratiotes* leaf extract in rats. *Int. J. of Pharmacy*, 2(3): 249-251.
- Pelczar, M.J dan Chan, E. C. S. 1998. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Terjemahan Ratna Siri hadioetomo, dkk. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.

- Premkumar, V.G. dan D. Shyamsundar. 2005. Antidermatophytic activity of *Pistia stratiotes*. *Indian J. of Pharma.* 37(2): 127-128.
- Rauha, J. P., S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kahkonen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela, dan P. Vuorela. 2000. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology.* 56:3-12.
- Robinson. 1995. *Phyto-chemistry in Plants*. Di dalam Naidu, A. S (ed). 2000. Natural Food microbial Systems. CRC Press. USA.
- Sharma, B.M. 1984. Ecophysiological studies on water lettuce in a polluted lake. *J. Aquatic Plant Manag.*, 22: 17-21.
- Setiabudy, R. 2007. *Farmakologi Dan Terapi*. Edisi 5. Jakarta: FK-Universitas Indonesia.
- Tiwari, P., Kumara, B., Kaur, M., & Kaur, H. 2011. Pythochemical Screening and Extraction: A Review. *Int. Pharm. Sci.* Vol 1: 1-9.
- Thamrin, H.R., Nani S., Agnes M.L., Ruslan A., ketut., Sumarsono. 2006. *Pokok Pemikiran Menuju Integrasi Obat Asli/Obat Bahan Alam Indonesia ke dalam Pelayanan Kesehatan*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Deputi Bidang Pengawaasan Obat Tradisional, Kosmetik dan Produk Komplemen.
- Thuong, P.T., M.K. Na, N.H. Dang, T.M. Hung, P.T. Ky, T.V. Thanh, N.H. Nam, N.D. Thuan, D.E. Sok dan K.H. Bae. 2006. *Nat. Prod. Sci.*, 12: 29.
- Tripathi, P., Kumar R., Sharma A.K., Mishra A., Gupta. 2010. *Pistia stratiotes (Jalkumbhi)*. India: Departement of Pharmacognosy Babu Banarasi Das National Institute of Technology and Management. I
- Wagner, H. dan Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy Research: Approaching a New Generation of Phytopharmaceuticals. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 16: 97-110.
- White, P.J. and Y. Xing. (1954). *Antioxidants from Cereals and Legumes dalam Foreidoon Shahidi: Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effect and Applications*. AOCS Press, Champaign, Illinois: 25-63.
- WHO. 2016a. Infectious Diseases http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/ [Diakses pada 3 Maret 2019].

LAMPIRAN**Lampiran A. Hasil Determinasi Tumbuhan Apu-apu**

Kode Dokumen : FR-AUK-064 Revisi : 0

**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>


SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN
No: 74/PL17.3.1.02/LL/2018


Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Farmasi Universitas Jember No: 3351/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 : Maulidya Barikatul I; Lilis Sapta Eka L; Irawati Firdiyansari
NIM : 152210101015; 152210101017; 152210101018
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: Liliopsida; Sub Kelas: Arecidae; Ordo: Arales; Famili: Araceae; Genus: Pistia; Spesies: Pistia stratiotes, L.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 4 Januari 2019
Kepala Laboratorium Tanaman

Lilik Nurstuti, MP
NIP. 195808201987032001

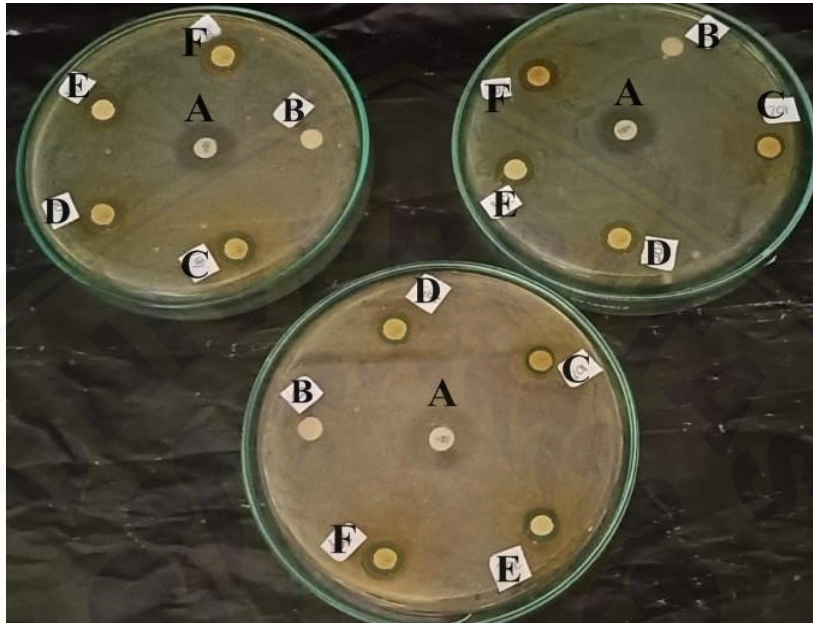


Lampiran B. Pembuatan Ekstrak**1. Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol herba Apu-apu**

Bobot serbuk kering herba apu-apu	= 195 gram
Volume etanol yang digunakan	= 1950 mL
Ekstrak kental	= 24,53 gram
Rendemen yang diperoleh	= $\frac{24,53 \text{ gram}}{195 \text{ gram}} \times 100\%$
	= 12,5 %

Lampiran C. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

1. Gambar Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Herba Apu- apu



Keterangan : (A) kontrol positif kloramfenikol (B) kontrol negatif DMSO 10%,
(C) konsentrasi 100 mg/mL (D) konsentrasi 200 mg/mL (E)
konsentrasi 300 mg/mL dan (F) konsentrasi 400 mg/mL.

2. Perhitungan Larutan Uji

b. Pembuatan Larutan DMSO 10%

Larutan DMSO 10% dibuat dengan memipet sebanyak 1 mL larutan DMSO kemudian diencerkan menggunakan akuades steril sebanyak 9 mL.

c. Konsentrasi yang Dibuat

1. 100 mg/mL

0,1 g/mL \rightarrow 0,1 gram ekstrak dilarutkan dalam 100 μ L DMSO kemudian divortex, ad aquadest 900 μ L.

2. 200 mg/mL

0,2 g/mL \rightarrow 0,2 gram ekstrak dilarutkan dalam 100 μ L DMSO kemudian divortex, ad aquadest 900 μ L.

3. 300 mg/mL

0,3 g/mL → 0,3 gram ekstrak dilarutkan dalam 100 μL DMSO kemudian divortex, ad aquadest 900 μL.

4. 400 mg/mL

0,4 g/mL → 0,4 gram ekstrak dilarutkan dalam 100 μL DMSO kemudian divortex, ad aquadest 900 μL.

3. Perhitungan nilai SD uji aktivitas antibakteri

- Replikasi 100 mg/mL

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \frac{\sqrt{(a-x)^2+(b-x)^2+(c-x)^2+(d-x)^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(8,1-8,2)^2+(8,3-8,2)^2+(8,2-8,2)^2}}{2} \\ &= \frac{\sqrt{0,01+0,01+0}}{2} \\ &= 0,1 \end{aligned}$$

- Replikasi 200 mg/mL

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \frac{\sqrt{(a-x)^2+(b-x)^2+(c-x)^2+(d-x)^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(9,4-9,2)^2+(9,1-9,2)^2+(9,2-9,2)^2}}{2} \\ &= \frac{\sqrt{0,04+0,01+0}}{2} \\ &= 0,15 \end{aligned}$$

- Replikasi 300 mg/mL

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \frac{\sqrt{(a-x)^2+(b-x)^2+(c-x)^2+(d-x)^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(9,5-9,9)^2+(10,1-9,9)^2+(10,3-9,9)^2}}{2} \\ &= \frac{\sqrt{0,16+0,04+0,16}}{2} \\ &= 0,4 \end{aligned}$$

- Replikasi 400 mg/mL

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \frac{\sqrt{(a-x)^2+(b-x)^2+(c-x)^2+(d-x)^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(10,9-11,2)^2+(11,2-11,2)^2+(11,4-11,2)^2}}{2} \\ &= \frac{\sqrt{0,09+0+0,04}}{2} \\ &= 0,25 \end{aligned}$$

- Kontrol positif Kloramfenikol 30 μg

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \frac{\sqrt{(a-x)^2+(b-x)^2+(c-x)^2+(d-x)^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(11,9-11,9)^2+(11,8-11,9)^2+(12,1-11,9)^2}}{2} \\ &= \frac{\sqrt{0+0,01+0,04}}{2} \\ &= 0,15 \end{aligned}$$

- Kontrol negatif DMSO 10%

$$\begin{aligned} \text{SD} &= \frac{\sqrt{(a-x)^2+(b-x)^2+(c-x)^2+(d-x)^2}}{n-1} \\ &= \frac{\sqrt{(0-0)^2+(0-0)^2+(0-0)^2}}{2} \\ &= \frac{\sqrt{0+0+0}}{2} \\ &= 0 \end{aligned}$$

4. Tabel hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol herba apu-apu terhadap *Salmonella typhimurium*.

Kelompok		Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata ±SD
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
Ekstrak uji	Konsentrasi 100 mg/mL	8,10	8,30	8,20	8,20 ± 0,1
	Konsentrasi 200 mg/mL	9,40	9,10	9,20	9,20 ± 0,15
	Konsentrasi 300 mg/mL	9,50	10,10	10,30	9,90 ± 0,4
	Konsentrasi 400 mg/mL	10,90	11,20	11,40	11,20 ± 0,25
Kontrol	Negatif (DMSO 10%)	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0
	Positif (kloramfenikol 30 µg)	11,90	11,80	12,10	11,90 ± 0,15

Keterangan:

R = replikasi

SD = Standar Deviasi

Diameter zona hambat termasuk diameter disk kosong (6 mm).

Lampiran D. Hasil Uji One Way ANOVA dan LSD

Tests of Normality^b

	SAMPEL	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ZONA_HAMBAT	10.00	.175	3	.	1.000	3	1.000
	20.00	.253	3	.	.964	3	.637
	30.00	.292	3	.	.923	3	.463
	40.00	.219	3	.	.987	3	.780
	60.00	.253	3	.	.964	3	.637

a. Lilliefors Significance Correction

b. ZONA_HAMBAT is constant when SAMPEL = 50.00. It has been omitted.

Keterangan : Jumlah kelompok uji <50, maka yang dilihat adalah hasil Test of *Normality Shapiro-Wilk*. Nilai kemaknaan yang diperoleh >0,05. Ini menunjukkan bahwa distribusi data normal.

Test of Homogeneity of Variances

ZONA_HAMBAT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.579	5	12	.033

Keterangan : *Significancy Test homogeneity* menunjukkan angka 0,565 ($p > 0,05$) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan varians antara kelompok uji yang dibandingkan dengan kata lain “variens data sama atau homogen”

ANOVA

ZONA_HAMBAT

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	281.658	5	56.332	1152.239	.000
Within Groups	.587	12	.049		
Total	282.245	17			

Keterangan : Nilai p yang diperoleh adalah 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya “ada perbedaan bermakna pada nilai zona hambatan pada semua kelompok uji”.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ZONA_HAMBAT

LSD

(I) SAMPEL	(J) SAMPEL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
100 mg/mL	200 mg/mL	-1.03333*	.18053	.000	-1.4267	-.6400
	300 mg/mL	-1.76667*	.18053	.000	-2.1600	-1.3733
	400 mg/mL	-2.96667*	.18053	.000	-3.3600	-2.5733
	Kloramfenikol 30µg	8.20000*	.18053	.000	7.8066	8.5934
	DMSO 10%	-3.73333*	.18053	.000	-4.1267	-3.3400
200 mg/mL	100 mg/mL	1.03333*	.18053	.000	.6400	1.4267
	300 mg/mL	-.73333*	.18053	.002	-1.1267	-.3400
	400 mg/mL	-1.93333*	.18053	.000	-2.3267	-1.5400
	Kloramfenikol 30µg	9.23333*	.18053	.000	8.8400	9.6267
	DMSO 10%	-2.70000*	.18053	.000	-3.0934	-2.3066
300 mg/mL	100 mg/mL	1.76667*	.18053	.000	1.3733	2.1600
	200 mg/mL	.73333*	.18053	.002	.3400	1.1267
	400 mg/mL	-1.20000*	.18053	.000	-1.5934	-.8066
	Kloramfenikol 30µg	9.96667*	.18053	.000	9.5733	10.3600
	DMSO 10%	-1.96667*	.18053	.000	-2.3600	-1.5733
400 mg/mL	100 mg/mL	2.96667*	.18053	.000	2.5733	3.3600
	200 mg/mL	1.93333*	.18053	.000	1.5400	2.3267
	300 mg/mL	1.20000*	.18053	.000	.8066	1.5934
	Kloramfenikol 30µg	11.16667*	.18053	.000	10.7733	11.5600
	DMSO 10%	-.76667*	.18053	.001	-1.1600	-.3733
Kloramfenikol 30µg	100 mg/mL	-8.20000*	.18053	.000	-8.5934	-7.8066
	200 mg/mL	-9.23333*	.18053	.000	-9.6267	-8.8400
	300 mg/mL	-9.96667*	.18053	.000	-10.3600	-9.5733
	400 mg/mL	-11.16667*	.18053	.000	-11.5600	-10.7733

	Kloramfeniko I 30 μ g	-11.93333*	.18053	.000	-12.3267	-11.5400
DMSO 10%	100 mg/mL	3.73333*	.18053	.000	3.3400	4.1267
	200 mg/mL	2.70000*	.18053	.000	2.3066	3.0934
	300 mg/mL	1.96667*	.18053	.000	1.5733	2.3600
	400 mg/mL	.76667*	.18053	.001	.3733	1.1600
	DMSO 10%	11.93333*	.18053	.000	11.5400	12.3267

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

Keterangan : kelompok 1 (kontrol positif), 2 (konsentrasi 100 mg/mL), 3 (konsentrasi 200 mg/mL), 4 (konsentrasi 300 mg/mL), dan 4 (konsentrasi 400 mg/mL), kelompok 5 (kontrol positif kloramfenikol), kelompok 6 (kontrol negatif DMSO 10%). Semua nilai p yang diperoleh 0,000 ($p < 0,05$). Maka perbedaan zona hambat pada konsentrasi uji berbeda secara bermakna pada semua kelompok.

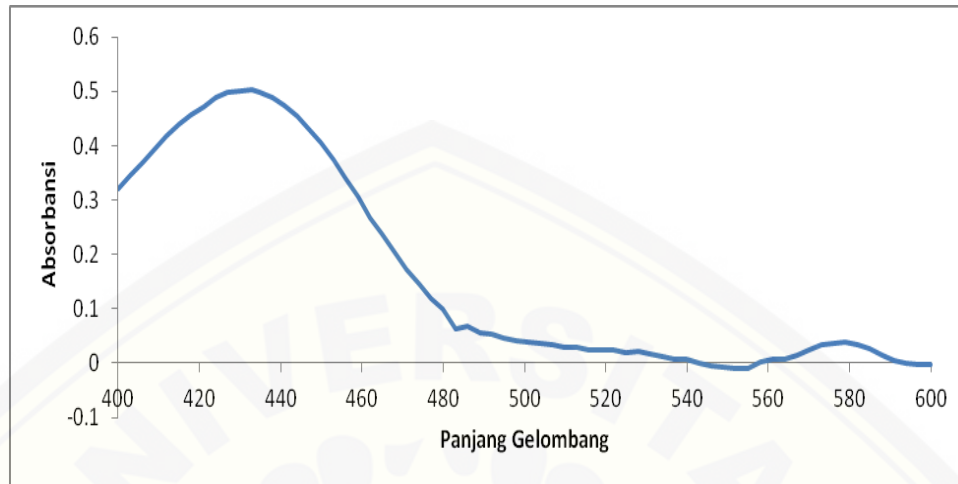
Lampiran E. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin.

Wave length Scan

Data Mode : ABS
 Scan Range : 600.0-400.0nm
 Slit Width : 4nm
 Speed (nm/min) : 300nm/min
 Lamp Change Wavelength : 340.0nm

600	-0.003	495	0.046
597	-0.002	492	0.054
594	0	489	0.055
591	0.004	486	0.069
588	0.015	483	0.062
585	0.027	480	0.099
582	0.034	477	0.12
579	0.038	474	0.146
576	0.037	471	0.173
573	0.033	468	0.204
570	0.024	465	0.237
567	0.015	462	0.268
564	0.007	459	0.306
561	0.007	456	0.34
558	0.002	453	0.374
555	-0.009	450	0.405
552	-0.01	447	0.431
549	-0.007	444	0.455
546	-0.004	441	0.474
543	-0.001	438	0.489
540	0.006	435	0.497
537	0.008	433	0.502
534	0.012	430	0.501
531	0.017	427	0.497
528	0.021	424	0.488
525	0.02	421	0.472
522	0.023	418	0.457
519	0.023	415	0.44
516	0.025	412	0.417
513	0.029	409	0.393
510	0.029	406	0.37
507	0.034	403	0.345
504	0.036	400	0.32
501	0.039		

2. Spektra Penetapan Panjang Gelombang Maksimum Flavonoid Dengan Penambahan AlCl_3 dan CH_3COOK pada panjang gelombang 433 nm.



Lampiran F. Hasil Optimasi Waktu Inkubasi Pengujian Kadar Flavonoid Total

1. Data Hasil Optimasi Waktu Inkubasi Standar Kuersetin Setelah Penambahan $AlCl_3$ dan CH_3COOK .

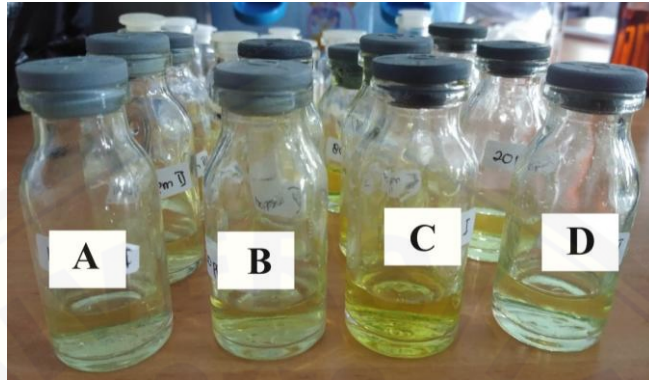
Waktu (menit)	Absorbansi
0	0,390
5	0,405
10	0,409
15	0,409
20	0,407
25	0,406
30	0,406
35	0,403
40	0,406
45	0,405
50	0,403
55	0,405
60	0,406

2. Data Hasil Optimasi Waktu Inkubasi Sampel Ekstrak Etanol 96% Herba Apu-apu Setelah Penambahan AlCl_3 dan CH_3COOK .

Waktu (menit)	Absorbansi
0	0,777
5	0,859
10	0,872
15	0,885
20	0,889
25	0,894
30	0,895
35	0,853
40	0,858
45	0,878
50	0,846
55	0,846
60	0,847

Lampiran G. Hasil Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Herba Apu-apu.

1. Gambar Preparasi Penetapan Kadar Standar Kuersetin



Keterangan: Standar Kuersetin (A) Konsentrasi 20 ppm, (B) Konsentrasi 40 ppm, (C) Konsentrasi 140 ppm dan (D) Konsentrasi 100 ppm.

2. Gambar Preparasi Penetapan Kadar Ekstrak Etanol Herba Apu-apu



Keterangan: Sampel ekstrak etanol herba apu-apu (A) Replikasi 1, (B) Replikasi 2 dan (C) Replikasi 3.

3. Hasil penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol herba apu-apu

Sampel	Kadar mg QE/g ekstrak		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
Ekstrak etanol	0,346	0,367	0,347
\pm SD	\pm 0,060		

Lampiran H. Perhitungan Bahan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Herba Apu-apu.

- a. Pembuatan Larutan $AlCl_3$ 10%

Ditimbang $AlCl_3$ sebanyak 2,5 gram di ad 25 mL etanol

- b. Pembuatan Larutan CH_3COOK 1 M

$$M_r = 98 \text{ g/mol}$$

$$M = \frac{m}{M_r} \times \frac{1}{V(L)}$$

$$1 \text{ M} = \frac{x}{98 \text{ g/mol}} \times \frac{1}{0,01 \text{ L}}$$

$$x = 1 \times 98 \times 0,01 \text{ gram}$$

$$= 0,98 \text{ gram}$$

Ditimbang sebanyak 0,98 gram CH_3COOK di ad 10 ml akudes.

- c. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Larutan induk yang dibuat adalah 2000 $\mu\text{g/mL}$

$$\frac{20 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 2000 \mu\text{g/mL}$$

Penimbangan kuersetin = 20,8 mg

$$\text{Larutan induk} = \frac{20,8 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 2080 \mu\text{g/mL}$$

Sebanyak 20,8 mg kuersetin dilarutkan dalam 10 mL etanol sehingga didapatkan konsentraasi 2080 $\mu\text{g/mL}$.

Pengenceran larutan induk :

$$\frac{0,1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 2080 \mu\text{g/mL} = 20,8 \mu\text{g/mL}$$

$$\frac{0,2 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 2080 \mu\text{g/mL} = 83,2 \mu\text{g/mL}$$

$$\frac{0,5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 2080 \mu\text{g/mL} = 104 \mu\text{g/mL}$$

$$\frac{0,7 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 2080 \mu\text{g/mL} = 145,6 \mu\text{g/mL}$$

- d. Pembuatan Ekstrak Uji

$$\frac{50 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL/L} = 5000 \mu\text{g/mL}$$

Sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL etanol sehingga didapatkan konsentrasi 5000 $\mu\text{g/mL}$. Pembuatan ekstrak uji dilakukan 3 kali replikasi.

Replikasi 1 = 50,4 mg

$$\frac{50,4 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mg/mL} = 5040 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Replikasi 2 = 50,4 mg

$$\frac{50,4 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mg/mL} = 5040 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Replikasi 3 = 50,4 mg

$$\frac{50,4 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mg/mL} = 5040 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

e. Pembuatan Blanko Negatif

2 mL etanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL AlCl_3 , 1 mL CH_3COOK dan 2,8 mL akuades ditunggu 25 menit.

f. Perhitungan Kadar Flavonoid

Sampel	Konsentrasi	Absorbansi
Kuersetin	20,8	0,422
	83,2	0,781
	104	0,885
	145,6	1,055
Ekstrak	5040	0,640
	5040	0,676
	5040	0,642

Persamaan kurva baku standar yang diperoleh yaitu $y = 0,059x + 0,332$ dengan nilai $r = 0,995$. Berdasarkan persamaan tersebut dapat ditentukan kadar flavonoid larutan sampel ekstrak etanol herba apu-apu ekuivalen kuersetin dengan menghitung nilai x . Absorbansi sampel ekstrak etanol herba apu-apu dimasukkan ke y . Perhitungan sebagai berikut:

- Replikasi 1

$$y = 0,059x + 0,332$$

$$0,640 = 0,059x + 0,332$$

$$x = 1,744 \text{ } \mu\text{g QE/mL}$$

dari nilai x dapat dihitung kadar flavonoid per berat ekstrak etanol herba apu-apu dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Kadar flavonoid} = \text{konsentrasi ekstrak} \times \frac{\text{volume larutan}}{\text{berat ekstrak}}$$

$$\text{Kadar flavonoid} = 1,744 \mu\text{g QE/mL} \times \frac{10 \text{ mL}}{0,0504}$$

$$\text{Kadar flavonoid} = 346,031 \mu\text{g QE/g ekstrak}$$

$$\text{Kadar flavonoid} = 0,346 \text{ mg QE/g ekstrak}$$

Jadi, dalam 1 gram ekstrak etanol 96% herba apu-apu mengandung 0,346 mg flavonoid yang setara dengan kuersetin.

- Replikasi 2

$$y = 0,059x + 0,332$$

$$0,676 = 0,059x + 0,332$$

$$x = 1,852 \mu\text{g QE/mL}$$

dari nilai x dapat dihitung kadar flavonoid per berat ekstrak etanol herba apu-apu dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Kadar flavonoid} = \text{konsentrasi ekstrak} \times \frac{\text{volume larutan}}{\text{berat ekstrak}}$$

$$\text{Kadar flavonoid} = 1,852 \mu\text{g QE/mL} \times \frac{10 \text{ mL}}{0,0504}$$

$$\text{Kadar flavonoid} = 367,460 \mu\text{g QE/g ekstrak}$$

$$\text{Kadar flavonoid} = 0,367 \text{ mg QE/g ekstrak}$$

Jadi, dalam 1 gram ekstrak etanol 96% herba apu-apu mengandung 0,367 mg flavonoid yang setara dengan kuersetin.

- Replikasi 3

$$y = 0,059x + 0,332$$

$$0,642 = 0,059x + 0,332$$

$$x = 1,750 \mu\text{g QE/mL}$$

dari nilai x dapat dihitung kadar flavonoid per berat ekstrak etanol herba apu-apu dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Kadar flavonoid} = \text{konsentrasi ekstrak} \times \frac{\text{volume larutan}}{\text{berat ekstrak}}$$

$$\text{Kadar flavonoid} = 1,750 \mu\text{g QE/mL} \times \frac{10 \text{ mL}}{0,0504}$$

$$\text{Kadar flavonoid} = 347,222 \mu\text{g QE/g ekstrak}$$

$$\text{Kadar flavonoid} = 0,347 \text{ mg QE/g ekstrak}$$

Jadi, dalam 1 gram ekstrak etanol 96% herba apu-apu mengandung 0,347 mg flavonoid yang setara dengan kuersetin.

g. Perhitungan Standar Deviasi dan CV

$$\begin{aligned}SD &= \frac{\sqrt{(a-x)^2+(b-x)^2+(c-x)^2}}{n-1} \\&= \frac{\sqrt{(1,744-1,782)^2+(1,852-1,782)^2+(1,750-1,782)^2}}{3-1} \\&= \frac{\sqrt{(0,00144)+(0,0049)+(0,001024)}}{2} \\&= 0,060\end{aligned}$$

Keterangan : a,b = kadar flavonoid ekstrak herba apu-apu

x = kadar rata-rata flavonoid ekstrak etanol herba apu-apu

n = banyaknya data

$$\begin{aligned}CV &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \\&= \frac{0,060}{1,782} \times 100\% \\&= 3,367 \%\end{aligned}$$