



**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI
DAUN KACA PIRING (*Gardenia augusta* Merr.) TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Oleh:

I Wayan Seniarta

NIM 152210101118

BAGIAN BIOLOGI FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2020



**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI
DAUN KACA PIRING (*Gardenia augusta* Merr.) 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:

I Wayan Seniarta

NIM 152210101118

**BAGIAN BIOLOGI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tua saya, bapak I Nyoman Rembang dan ibu Ni Wayan Wati yang selalu memberikan nasehat, dukungan, dan doa sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
2. Adik saya I Kadek Artawan dan keluarga besar lainnya yang selalu memberikan kasih sayang, nasehat, dukungan, dan doa selama saya menuntut ilmu;
3. Guru-guru saya dari taman kanak-kanak (TK) Taman Sari, SMPN 1 Semarapura, SMAN 1 Semarapura, dan sampai dengan Perguruan Tinggi;
4. Almamater Fakultas Farmasi Univeristas Jember.

MOTO

“Hidup bukanlah dinilai dari seberapa ilmu yang kamu peroleh, melainkan seberapa berguna dirimu bagi orang lain”

“Saking tuhu manah guru, mituturin cening jani, kaweruhe luir senjata, ne dadi prabotan sai, ka anggen ngaruruh merta, seenun ceninge urip”

Artinya:

“Sang Guru dengan penuh perhatian dan kesungguhan, memberikan petuah pada muridnya, pengetahuan itu bagaikan senjata yang dapat dipergunakan sehari-hari, terutama untuk menyambung hidup, mencari penghidupan, selagi kamu masih hidup”

(Pupuh Ginanti)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : I Wayan Seniarta

NIM : 152210101118

menyatakan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Kaca Piring (*Gardenia augusta* Merr.) 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 di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 9 Januari 2020

Yang menyatakan,



I Wayan Seniarta

NIM 152210101118,

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI
DAUN KACA PIRING (*Gardenia augusta* Merr.) TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

Oleh:

I Wayan Seniarta

NIM 152210101118

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Kaca Piring (*Gardenia augusta* Merr.) terhadap *Staphylococcus aureus*” karya I Wayan Seniarta telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 9 Januari 2020

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,



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

Dosen Pembimbing Anggota,



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

Tim Penguji

Dosen Penguji I,



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

Dosen Penguji II,



Endah Puspitasari., S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP. 198107232006042002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember



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

NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Kaca Piring (*Gardenia augusta* Merr.) terhadap *Staphylococcus aureus*; I Wayan Seniarta, 152210101118; 2019; 36 Halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Pneumonia hingga saat ini masih menjadi permasalahan utama dalam bidang kesehatan di seluruh dunia. Pneumonia dapat disebabkan oleh berbagai macam mikroorganisme, termasuk bakteri. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan pneumonia adalah bakteri *Staphylococcus aureus*. Antibiotika merupakan agen antibakteri yang sering digunakan untuk penanganan infeksi bakteri *S. aureus*, namun irasionalitas terapi antibiotika yang tidak terkontrol menyebabkan kegagalan klinis penanganan infeksi bakteri tersebut. Penelusuran agen antibakteri baru perlu dilakukan untuk penanganan infeksi bakteri *S. aureus*, salah satunya melalui eksplorasi antibakteri berbasis pemanfaatan bahan alam.

Tanaman kaca piring (*Gardenia augusta*) dari suku Rubiaceae adalah salah satu tanaman genus *Gardenia* yang dapat dimanfaatkan untuk pengobatan. Secara tradisional, kaca piring dapat digunakan untuk mengobati beberapa penyakit diantaranya diare, disentri, dan infeksi vagina. Ekstrak kalus dari kultur daun kaca piring, infusa dan ekstrak etanol daun kaca piring memiliki aktivitas antibakteri terhadap berbagai macam bakteri, namun belum ditemukan aktivitas antibakteri tanaman kaca piring terhadap *S. aureus*.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring terhadap *S. aureus*. Ekstraksi simplisia daun kaca piring dilakukan menggunakan metode remaserasi dan dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan metode partisi cair-cair untuk mendapatkan fraksi heksana, etil asetat, dan etanol air. Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun kaca piring dilakukan menggunakan metode difusi cakram dengan gentamisin cakram 10 µg sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif.

Hasil pengujian dengan menggunakan 5 seri konsentrasi uji yaitu, 10, 20, 30, 40, dan 50% b/v menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada ekstrak

etanol, fraksi heksana, fraksi etil asetat, tetapi tidak pada fraksi etanol air. Aktivitas antibakteri yang paling tinggi terlihat pada fraksi etil asetat, sehingga dilanjutkan dengan skrining fitokimia metode KLT. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat, yaitu alkaloid, terpenoid, dan flavonoid.



PRAKATA

Sembah bakti dihadapan Ida Sang Hyang Widhi Wasa atas asung kerta wara nugraha Ida, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Kaca Piring (*Gardenia augusta* Merr.) terhadap *Staphylococcus aureus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Bapak Antonius Nugraha W.P., S. Farm., M.P.H., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu memberikan bimbingan dan motivasi selama menjadi mahasiswa;
3. Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt. dan bapak Moch. Amrun H., S.Si., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan, saran, dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini terselesaikan;
4. Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt., dan ibu Endah Puspitasari., S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. Laboran Bagian Biologi Farmasi, ibu Widi dan mbak Parka yang telah meluangkan waktu dan bantuannya sehingga penelitian ini dapat terselesaikan;
6. Teman seperjuangan “Kaca Piring Team” Tahir dan Azizah yang selalu memberi motivasi, semangat, doa, dan menjadi tempat berbagi keluh kesah dalam melaksanakan penelitian ini;
7. Teman-teman bidadari Laboratorium Biologi yang selalu membantu dalam melaksanakan penelitian ini;

8. Keluarga besar “Koskoeng” Mbah Kung, Dek Po, Bli Arya, dan teman lainnya yang selalu membantu, memberikan semangat, doa, dan motivasi selama menjalani pendidikan sebagai mahasiswa;
9. Keluarga besar PC KMHDI Jember yang selalu bersemangat dan berjuang bersama dalam mengawal serta menyuarakan aspirasi mahasiswa demi sebuah pengabdian;
10. Teman-teman “LIBITUM” angkatan 2015 yang selalu berjuang dan bekerja keras demi tercapainya gelar Sarjana Farmasi;
11. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk pembaca.

Jember, 9 Januari 2020

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Penyakit Pneumonia	5
2.2 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2.1. Klasifikasi Taksonomi.....	6
2.2.2. Morfologi Bakteri.....	7
2.2.3. Patogenesis	7
2.2.4. Patologi.....	7
2.3 Tanaman Kaca Piring.....	8
2.3.1 Klasifikasi Taksonomi.....	8
2.3.2 Nama Lokal dan Sebaran Tanaman.....	9

2.3.3 Deskripsi Tanaman.....	9
2.3.4 Kandungan Kimia.....	9
2.4 Tinjauan Metode Ekstraksi.....	10
2.5 Tinjauan Metode Fraksinasi.....	11
2.6 Metode Uji Antibakteri.....	12
2.6.1 Metode Difusi.....	12
2.6.2 Metode Dilusi.....	13
2.6.3 Metode Bioautografi.....	13
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	15
3.1 Jenis Penelitian.....	15
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
3.3 Variabel Penelitian.....	15
3.3.1 Variabel Bebas.....	15
3.3.2 Variabel Terikat.....	15
3.3.3 Variabel Terkendali.....	15
3.4 Rancangan Penelitian.....	16
3.5 Definisi Operasional.....	16
3.6 Alat dan Bahan.....	17
3.7 Tahapan Penelitian.....	18
3.7.1 Identifikasi Tanaman.....	18
3.7.2 Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Kaca Piring.....	18
3.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kaca Piring.....	18
3.7.4 Fraksinasi Ekstrak Etanol.....	19
3.7.5 Uji Antibakteri.....	19
3.7.6 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	21
3.7.7 Pembuatan Larutan Kontrol.....	21
3.7.8 Pembuatan Larutan Uji.....	21
3.8 Tahap Pengujian Aktivitas Antibakteri.....	22
3.9 Tahap Pengamatan.....	22
3.10 Analisis Data.....	23

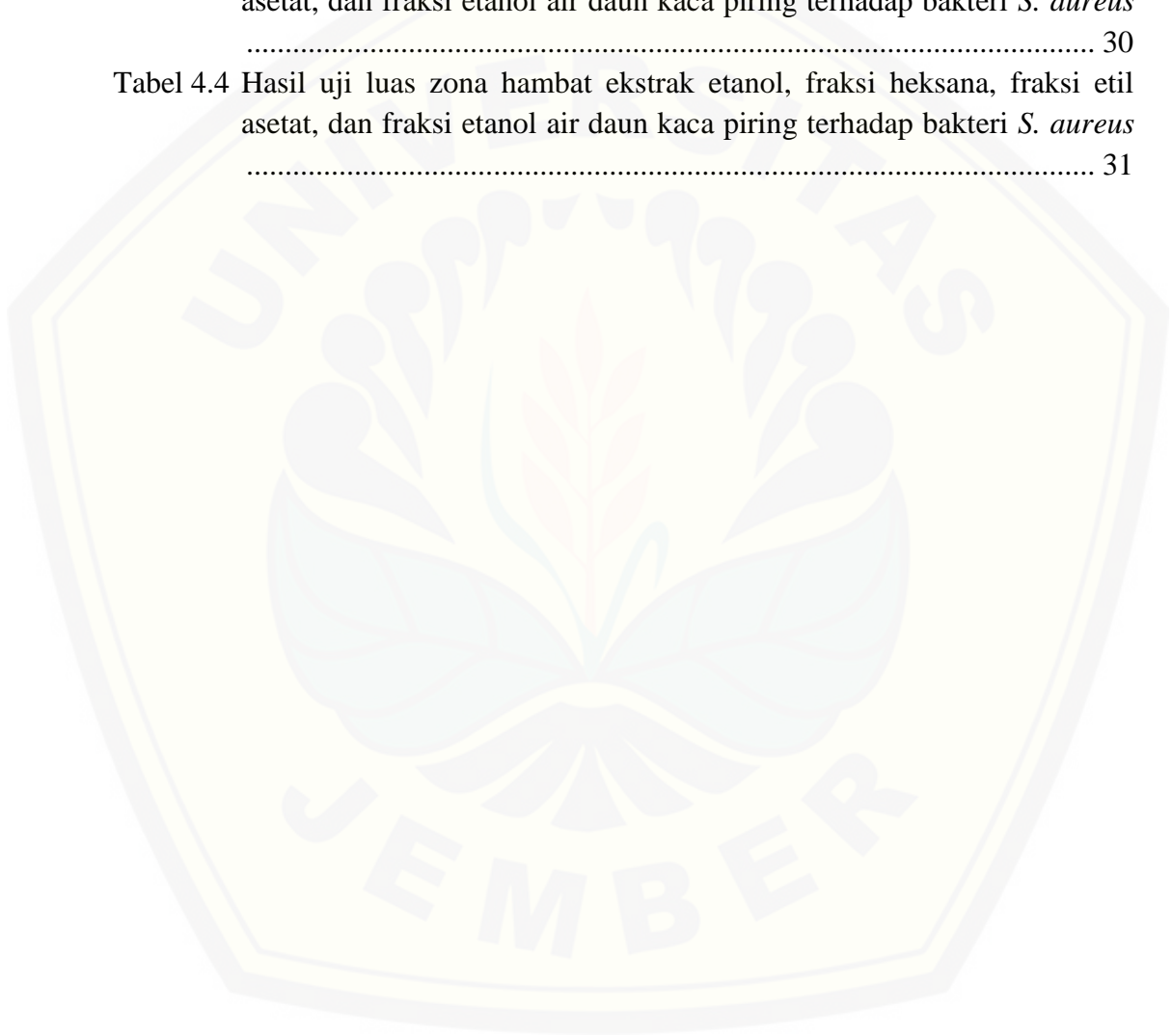
3.11 Skrining Fitokimia Metode KLT.....	23
3.12 Skema Prosedur Penelitian	26
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Identifikasi Tanaman Kaca Piring.....	27
4.2 Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Kaca Piring.....	27
4.3 Uji Aktivitas Antibakteri.....	29
BAB 5. PENUTUP.....	36
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	6
Gambar 2.2 Tanaman kaca piring (<i>Gardenia jasminoides</i>).....	8
Gambar 3.1 Rancangan penelitian uji aktivitas antibakteri	16
Gambar 3.2 Skema proses dari fraksinasi.....	19
Gambar 3.3 Desain metode difusi cakram pada cawan petri.....	22
Gambar 3.4 Skema prosedur penelitian.....	26
Gambar 4.1 Hasil uji aktivitas antibakteri (A) ekstrak etanol, (B) fraksi heksana, (C) fraksi etil asetat, dan (D) fraksi etanol air dari daun kaca piring terhadap <i>S. aureus</i>	32
Gambar 4.2 <i>Trend</i> diameter zona hambat antibakteri dan signifikansi antar konsentrasi pada ekstrak etanol, fraksi heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol air, notasi huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar konsentrasi pada sampel yang sama	33
Gambar 4.3 <i>Trend</i> luas zona hambat antibakteri dan signifikansi antar konsentrasi pada ekstrak etanol, fraksi heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol air, notasi huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar konsentrasi pada sampel yang sama	34

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Rendemen ekstrak etanol daun kaca piring	27
Tabel 4.2 Rendemen fraksi daun kaca piring	28
Tabel 4.3 Hasil uji diameter zona hambat ekstrak etanol, fraksi heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol air daun kaca piring terhadap bakteri <i>S. aureus</i>	30
Tabel 4.4 Hasil uji luas zona hambat ekstrak etanol, fraksi heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol air daun kaca piring terhadap bakteri <i>S. aureus</i>	31



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Hasil Identifikasi Tanaman Kaca Piring (<i>Gardenia augusta</i>)	43
Lampiran B. Perhitungan Rendemen Ekstrak dan Fraksi	44
Lampiran C. Perhitungan Larutan Uji Ekstrak, Fraksi, dan DMSO 10% Sebagai Kontrol Negatif	45
Lampiran D. Hasil Penapisan Fitokimia Fraksi Etil Asestat dengan Metode KLT	48
Lampiran E. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak dan Fraksi Daun Kaca Piring terhadap Bakteri <i>S. aureus</i>	49
Lampiran F. Hasil Pengukuran Luas Zona Hambat Ekstrak dan Fraksi Daun Kaca Piring terhadap Bakteri <i>S. aureus</i>	50
Lampiran G. Hasil Analisis Data Statistik Diameter Zona Hambat Ekstrak dan Fraksi Daun Kaca Piring.....	51
Lampiran H. Hasil Analisis Data Statistik Luas Zona Hambat Ekstrak dan Fraksi Daun Kaca Piring.....	60
Lampiran I. Perbandingan Luas Zona Hambat Pengukuran dengan Jangka Sorong dan <i>Software ImageJ</i>	71
Lampiran J. Hasil Uji <i>T-Test</i> Diameter dan Luas Zona Hambat Aktivitas Antibakteri	72
Lampiran K. Cara Analisis Data Luas dengan <i>Software ImageJ</i>	75

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pneumonia hingga saat ini masih menjadi permasalahan utama dalam bidang kesehatan di seluruh dunia. Pneumonia merupakan penyebab utama kematian pada balita di tahun 2015, dengan angka mortalitas sebesar 15% atau sebanyak 920.136 juta anak mengalami kematian (FIRS, 2017). Di Indonesia, pneumonia menempati peringkat kedua sebagai salah satu penyebab kematian pada balita. Jumlah kasus yang terjadi akibat penyakit ini diperkirakan sebesar 3,55% (Kementerian Kesehatan RI, 2018). Bahkan, terjadi peningkatan jumlah kasus pneumonia yang signifikan pada tahun 2017 dari 2016 sebesar 5,9% (Kochanek dkk., 2019).

Pneumonia dapat disebabkan oleh berbagai macam mikroorganisme, termasuk bakteri (PDPI, 2003). Bakteri menyebabkan pneumonia dengan cara memicu terjadinya peradangan alveolar dan edema yang menimbulkan pembengkakan pada daerah kapiler yang kemudian berkembang menjadi stasis darah (Dunn, 2005). Beberapa spesies bakteri yang dapat menyebabkan pneumonia, antara lain *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Grup B Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus* (Kementerian Kesehatan RI, 2010).

Bakteri *S. aureus* merupakan flora normal manusia yang terdapat pada daerah kulit, saluran pernapasan, dan pencernaan. Bakteri ini ditemukan sebanyak 20-50% di dalam rongga hidung manusia. Bakteri *S. aureus* secara teratur banyak ditemukan pada pakaian maupun benda lain yang terdapat di lingkungan sekitar. Bakteri tersebut dapat bersifat patogen dan invasif dengan menghasilkan enzim koagulase (Brooks dkk., 2013). Bakteri *S. aureus* juga menjadi salah satu penyebab pneumonia yang terjadi pada balita di Indonesia (Kementerian Kesehatan RI, 2010).

Antibiotika merupakan agen antibakteri yang sering digunakan untuk penanganan infeksi bakteri *S. aureus*, namun irasionalitas terapi antibiotika yang

tidak terkontrol menyebabkan kegagalan klinis penanganan infeksi bakteri tersebut. Kegagalan klinis penggunaan beberapa antibiotika seperti vankomisin (Dombrowski dan Winston, 2008), daptomisin (Skiest, 2006), dan *cefexime* (Prabowo dan Habib, 2012) dapat meningkatkan terjadinya resistensi bakteri *S. aureus*. Oleh karena itu, penelusuran agen antibakteri baru perlu dilakukan untuk penanganan infeksi bakteri *S. aureus*, salah satunya melalui eksplorasi antibakteri berbasis pemanfaatan bahan alam.

Tanaman merupakan salah satu bahan alam yang banyak dikonsumsi sebagai bahan pangan (Yuan dkk., 2016). Tanaman juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat karena sebanyak 25% dari semua obat yang diresepkan berasal dari tanaman (Rout dkk., 2009). Diperkirakan terdapat sebanyak 250 hingga 500 ribu spesies tanaman yang dapat digunakan dalam pengobatan (Yuan dkk., 2016), akan tetapi hanya sebanyak 15% yang telah dievaluasi kandungan fitokimia dan sebanyak 6% yang telah dievaluasi aktivitas biologisnya (Rout dkk., 2009). Tanaman juga dianggap mempunyai efek samping relatif lebih kecil daripada menggunakan obat dari bahan sintesis (Tuna dkk., 2015).

Tanaman kaca piring (*Gardenia augusta*) dari suku Rubiaceae adalah salah satu tanaman genus *Gardenia* yang dapat dimanfaatkan untuk pengobatan. Secara tradisional, rebusan daun kaca piring di Indonesia dapat digunakan untuk mengobati beberapa penyakit diantaranya diare, disentri, dan infeksi vagina (Romulo dkk., 2018). Di Uganda, akar kaca piring juga dipercaya memiliki beberapa manfaat untuk tujuan pengobatan dengan metode penerapan yang berbeda-beda. Infusa dari akarnya dapat digunakan untuk mengobati gigitan ular, teh yang dicampur dengan serbuk akarnya dapat digunakan sebagai antidot, dan getah dari akarnya yang dihirup dapat digunakan sebagai obat penenang dan migrain (Tabuti dkk., 2003).

Ditinjau dari berbagai macam senyawa kimia, seperti minyak atsiri, saponin, flavonoid, dan polifenol yang terkandung didalamnya (Dalimartha, 2003), kaca piring berpotensi dikembangkan sebagai agen antibakteri. Hal tersebut dibuktikan dengan dilakukannya beberapa penelitian tentang uji aktivitas antibakteri tanaman kaca piring terhadap beberapa spesies bakteri. Salah satu

contoh, yaitu ekstrak kalus dari kultur daun kaca piring pada konsentrasi 100 g/L dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* dan *E. coli* (Farzinebrahimi dkk., 2014). Infusa daun kaca piring juga memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi 6,25; 12,5; dan 25% terhadap *Streptococcus mutans* dan pada pada konsentrasi 12,5; 25; dan 50% terhadap *Streptococcus salivarius* (Wulandari dkk., 2013). Ekstrak etanol daun kaca piring juga menghasilkan zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* pada konsentrasi 10, 20, 30, dan 40% (Hasyim, 2019), tetapi belum ditemukan aktivitas antibakteri tanaman kaca piring terhadap bakteri lain.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring terhadap *S. aureus*. Ekstraksi simplisia daun kaca piring dilakukan menggunakan metode remaserasi dan dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan metode partisi cair-cair. Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun kaca piring dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Hasil pada penelitian ini berupa diameter nilai zona hambat yang diukur menggunakan jangka sorong. Selain itu, pengukuran luas zona hambat juga dilakukan menggunakan *software ImageJ*. Diharapkan, *software ImageJ* dapat digunakan sebagai referensi baru untuk mengukur nilai zona hambat aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring terhadap *S. aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka timbul beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring (*Gardenia augusta* Merr.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*?
2. Manakah di antara ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring (*Gardenia augusta* Merr.) yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap *Staphylococcus aureus*?

3. Golongan senyawa apakah yang terkandung pada ekstrak etanol atau fraksi daun kaca piring (*Gardenia augusta* Merr.) yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap *Staphylococcus aureus*?
4. Apakah ada perbedaan aktivitas antibakteri menggunakan diameter dan luas zona hambat?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi (heksana, etil asetat, dan etanol air) daun kaca piring (*Gardenia augusta* Merr.) terhadap *Staphylococcus aureus*.
2. Mengetahui di antara ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring (*Gardenia augusta* Merr.) yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap *Staphylococcus aureus*.
3. Mengetahui golongan senyawa yang terkandung pada ekstrak etanol atau fraksi daun kaca piring (*Gardenia augusta* Merr.) yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap *Staphylococcus aureus*.
4. Mengetahui perbedaan aktivitas antibakteri menggunakan diameter dan luas zona hambat.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dilakukannya penelitian ini adalah dapat memanfaatkan serta mengembangkan daun dari tanaman kaca piring yang terdapat di Kecamatan Umbulsari Kabupaten Jember sebagai agen antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Pneumonia

Pneumonia adalah suatu peradangan atau infeksi yang terjadi pada parenkim paru (Kasper dkk., 2015). Pneumonia dapat dikelompokkan menjadi dua jenis, yaitu pneumonia komunitas dan pneumonia nosokomial. Pneumonia komunitas adalah pneumonia yang terjadi di luar lingkungan rumah sakit, sedangkan pneumonia nosokomial adalah pneumonia yang diperoleh ketika masyarakat atau pasien menjalani rawat inap di rumah sakit minimal selama 2 hari atau lebih (Dunn, 2005).

Pneumonia dapat disebabkan oleh berbagai macam mikroorganisme, termasuk bakteri. Pneumonia komunitas yang dialami oleh masyarakat di luar negeri lebih banyak disebabkan oleh bakteri gram positif, sedangkan di Indonesia lebih banyak disebabkan oleh bakteri gram negatif (PDPI, 2003). Pada pneumonia nosokomial dapat disebabkan oleh bakteri gram positif atau negatif (Azmi dkk., 2016). Beberapa spesies bakteri gram positif yang sering menyebabkan pneumonia, yaitu *S. pneumoniae*, *Grup B Streptococcus*, dan *S. aureus*, sedangkan bakteri gram negatif, yaitu *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, dan *E. coli* (Kementerian Kesehatan RI, 2010).

Pneumonia dihasilkan dari proliferasi mikroba patogen (bakteri) pada daerah alveolar yang menyebabkan terjadinya respon sel inang terhadap mikroba tersebut. Mikroba yang masuk melalui udara dapat mencapai alveolus, sehingga menyebabkan terjadinya proses infeksi. Infeksi yang terjadi diawali dengan terbentuknya kolonisasi mikroba pada saluran pernapasan bagian atas (orofaring) yang kemudian berpindah menuju saluran pernapasan bagian bawah yang merupakan proses dari inokulasi mikroba. Proses tersebut terjadi ketika seseorang dalam keadaan tertidur atau dengan tingkat kesadaran yang menurun (Kasper dkk., 2015). Sekresi dari orofaring mengandung jumlah mikroba yang sangat tinggi 10^{8-10} /ml, sehingga pada proses aspirasi dari sebagian kecil sekret (0,001 -

1,1 ml) mampu menghasilkan jumlah inokulum bakteri yang tinggi pada alveolus dan menyebabkan terjadinya pneumonia (PDPI, 2003).

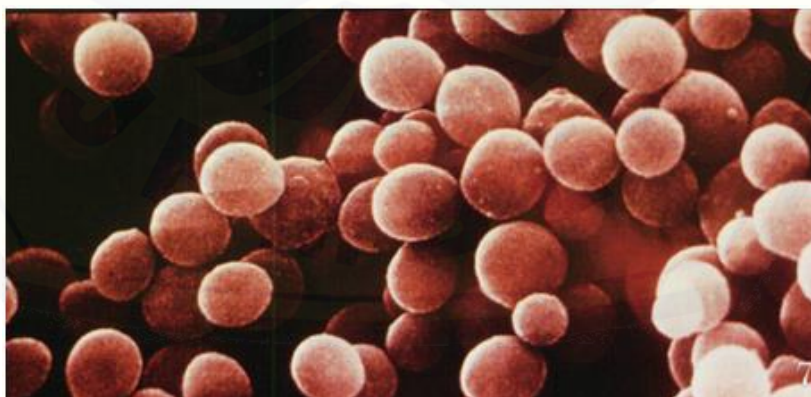
Manifestasi klinis yang ditimbulkan ketika mengalami pneumonia, antara lain demam, *malaise*, nyeri dada karena pleuritik, dan batuk persisten yang disertai dengan dahak berwarna kuning, hijau atau bernoda darah (Dunn, 2005). Gejala fisik lain pada dada biasanya tergantung dari luas lesi yang terjadi di paru-paru. Selain itu, pada saat pemeriksaan dapat diketahui bagian yang sakit tertinggal ketika waktu bernapas (PDPI, 2003).

2.2 Bakteri *Staphylococcus aureus*

2.2.1. Klasifikasi Taksonomi

Taksonomi dari bakteri *Staphylococcus aureus*, sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcusceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i> (Todar, 2008)



Gambar 2.1 Bakteri *Staphylococcus aureus* (Sumber: Todar, 2008)

2.2.2. Morfologi Bakteri

S. aureus merupakan bakteri nonmotil, tidak membentuk spora (Torok dkk., 2017) dan termasuk dalam bakteri gram positif (Bagnoli dkk., 2017). Bakteri *S. aureus* tersusun atas beberapa lapisan peptidoglikan yang mengandung protein, polisakarida, dan gliserol (Brooks dkk., 2013). Bakteri ini berkembang dengan cepat di suhu 37°C pada kondisi aerobik atau mikroaerofilik dan dapat membentuk pigmen pada suhu kamar (20-25°C). Ukuran diameter bakteri *S. aureus* sebesar 1 µm dengan membentuk koloni seperti bola yang tidak teratur. Koloni dari bakteri *S. aureus* berwarna abu-abu hingga kuning keemasan (Brooks dkk., 2013), dapat dilihat pada Gambar 2.1.

2.2.3. Patogenesis

Bakteri *S. aureus* merupakan flora normal manusia yang terdapat pada daerah kulit, saluran pernapasan, dan pencernaan. Bakteri ini ditemukan sebanyak 20-50% pada rongga hidung manusia. Secara teratur, bakteri *S. aureus* banyak terdapat pada pakaian maupun benda lain yang terdapat di lingkungan sekitar (Brooks dkk., 2013).

Patogenesis dari bakteri *S. aureus* memberikan efek gabungan melalui faktor ekstraseluler dan toksin bakteri yang bersifat invasif (Brooks dkk., 2013). Keracunan akibat infeksi *S. aureus* disebabkan karena bakteri tersebut mampu memproduksi enterotoksin di dalam makanan (Hennekinne, 2018) serta dapat menyebabkan abses pada semua organ (Carroll dkk., 2015). *S. aureus* yang bersifat patogen dan invasif menghasilkan enzim koagulase sehingga dapat membentuk pigmen yang berwarna kuning yang bersifat hemolitik. Bakteri ini juga bersifat refraktori terhadap pengobatan karena dapat membentuk lapisan biofilm (Brooks dkk., 2013).

2.2.4. Patologi

Infeksi khas yang ditimbulkan oleh *S. aureus*, yaitu berupa abses atau nanah. Bakteri ini dapat menyebar melalui sistem limfatik dan aliran darah menuju bagian tubuh yang lain. Pada osteomielitis, pertumbuhan *S. aureus* terjadi

pada bagian pembuluh darah terminal dari metafisis tulang panjang sehingga menimbulkan nekrosis tulang. Bakteri ini dapat menyebabkan pneumonia, meningitis, empiema, endokarditis atau sepsis dengan nanah pada organ manapun di dalam tubuh. *S. aureus* dengan tingkat invasi yang rendah dapat menyebabkan infeksi pada kulit, seperti jerawat, pioderma, dan impetigo. Bakteri ini juga menyebabkan penyakit melalui elaborasi racun tanpa disertai infeksi yang jelas. Impetigo bolusa dan *scalded skin syndrome* juga disebabkan oleh *S. aureus* yang menghasilkan racun eksfoliatif (Brooks dkk., 2013; Carroll dkk., 2015).

2.3 Tanaman Kaca Piring

2.3.1 Klasifikasi Taksonomi

Taksonomi dari tanaman kaca piring (USDA, 2000), yaitu sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Asteridae
Ordo	: Rubiales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: <i>Gardenia</i>
Spesies	: <i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis



Gambar 2.2 Tanaman kaca piring (*Gardenia jasminoides*)
(Sumber: Dokumentasi pribadi)

2.3.2 Nama Lokal dan Sebaran Tanaman

Tanaman kaca piring adalah tanaman yang termasuk ke dalam famili *Rubiaceae* yang secara alami berasal dari Cina dan Jepang. Tanaman kaca piring atau *G. augusta* memiliki nama botani lain, seperti *G. florida* L. dan *G. jasminoides* Ellis (Kobayashi dan Kaufman, 2006). Tanaman ini juga banyak tersebar di Indonesia dengan nama daerah yang berbeda-beda, seperti raja putih (Sumatera), ceplok piring, peciring, cepiring (Jawa), kaca piring, sangklapa (Maluku), dan jempiring (Nusa Tenggara) (Dalimartha, 2003).

2.3.3 Deskripsi Tanaman

Kaca piring merupakan tanaman perdu yang tingginya mencapai 1-2 meter, tumbuh optimal pada ketinggian 400 m dpl serta baru dapat berbuah jika tumbuh pada ketinggian 3000 kaki dpl. Tanaman ini memiliki batang berkayu dengan bentuk bulat dan bercabang banyak. Daun pada tanaman ini termasuk daun tidak lengkap karena hanya mempunyai tangkai dan helaian daun. Warna daun hijau tua dengan permukaan yang dilapisi lilin, letak daunnya berhadapan, tangkai daunnya pendek dengan bentuk bulat telur, serta ujung dan pangkal daunnya berbentuk runcing, tepi daun rata, panjang daun berkisar 4,5-13 cm dan lebar daun berkisar 2-5 cm. Secara alami tanaman kaca piring memiliki sistem perakaran, yaitu akar tunggang. Berbunga tunggal dengan tangkai yang pendek, berwarna putih, dan mengeluarkan bau yang harum. Buah yang dihasilkan termasuk ke dalam buah sejati yang berbentuk bulat telur dengan lapisan kulit yang tipis, serta berwarna kuning hingga jingga (Dalimartha, 2003), dapat dilihat pada Gambar 2.2.

2.3.4 Kandungan Kimia

Tanaman kaca piring mengandung berbagai macam senyawa kimia, seperti saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri (Dalimartha, 2003). Ekstrak etanol kulit batang tanaman kaca piring mengandung beberapa metabolit sekunder, seperti alkaloid, tanin, saponin, dan fenol (Kumar dkk., 2017). Ekstrak etanol daun kaca piring juga mengandung beberapa metabolit sekunder, antara

lain alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, dan polifenol (Hasyim, 2019). Beberapa metabolit sekunder, seperti alkaloid, terpenoid, flavonoid, dan polifenol berpotensi memiliki aktivitas sebagai agen antibakteri (Cowan, 1999; Cushnie dkk., 2014).

Iridoid, glikosida iridoid, triterpenoid, asam organik, dan senyawa volatil merupakan beberapa komponen kimia dari tanaman kaca piring yang telah melalui tahap isolasi dan karakterisasi. Senyawa aktif utama yang ditemukan pada tanaman ini, antara lain geniposid, genipin, gardenosis, crosin, dan iridoid (Xiao dkk., 2016). *G. elata*, *G. gjellerupii*, dan *G. volkensii* merupakan beberapa spesies lain yang telah diidentifikasi kandungan kimianya menggunakan kromatografi gas yang dikombinasi dengan spektrometri massa oleh Suwannakud dkk. (2017). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung di dalam daun pada ketiga tanaman genus *Gardenia* tersebut, diantaranya α -pinen, terpinen, β -pinen, dan neophytadiene.

2.4 Tinjauan Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan senyawa aktif dari berbagai komponen senyawa yang terkandung dalam simplisia tanaman dengan memakai pelarut yang selektif. Sepanjang berlangsung proses ekstraksi, pelarut akan berdifusi ke dalam simplisia tanaman dan menarik kandungan senyawa dari simplisia berdasarkan tingkat polaritas yang sama (Pandey dan Tripathi, 2014). Bagian dari tanaman yang banyak diekstraksi, yaitu daun, kayu, kulit kayu, akar, buah, dan bunga baik dalam kondisi segar ataupun kering (Azwanida, 2015).

Metode maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang paling sederhana dan banyak diterapkan. Metode ini diawali dengan merendam sejumlah serbuk simplisia tanaman dalam wadah menggunakan pelarut tertentu pada suhu kamar dan dalam waktu yang telah ditentukan. Proses ini bertujuan untuk melunakkan dan menghancurkan dinding sel dari simplisia tanaman, sehingga melepaskan senyawa fitokimia yang terlarut. Larutan ekstrak kemudian difiltrasi dan diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kental tanaman (Azwanida, 2015).

Keuntungan dari metode maserasi, yaitu dapat digunakan untuk mengekstraksi komponen senyawa kimia yang bersifat termolabil, sedangkan kekurangannya yaitu memerlukan waktu ekstraksi yang cukup lama (Zhang dkk., 2018).

Penelitian terkait proses ekstraksi tanaman genus *Gardenia* menggunakan metode maserasi telah banyak dilakukan. Salah satu contoh, yaitu sebanyak 10 gram serbuk simplisia daun *G. latifolia* dimaserasi dengan 100 mL air suling steril selama 24 jam (Tamilselvi dkk., 2017). Selanjutnya, sejumlah 500 gram serbuk kasar daun *G. coronaria* dimaserasi dalam metanol selama 7 hari (Chowdhury dkk., 2014). Penelitian lain juga menyebutkan sebanyak 10 gram serbuk simplisia daun dan buah *G. gummifera* dimaserasi menggunakan pelarut metanol dalam wadah tertutup rapat selama 48 jam (Pushpavathi dkk., 2017).

2.5 Tinjauan Metode Fraksinasi

Fraksinasi adalah proses pemisahan komponen campuran seperti ekstrak kasar tanaman, mikroba, dan hewan menjadi golongan senyawa yang memiliki polaritas atau ukuran molekul yang sama. Fraksi dapat dilihat secara fisik seperti dua fase ekstraksi cair-cair atau hasil dari eluasi pada kromatografi kolom. Beberapa metode fraksinasi yang sering digunakan, salah satunya adalah partisi cair-cair (Houghton dan Raman, 1998; Sarker, 2012).

Pada partisi cair-cair, cairan ditambahkan ke dalam ekstrak yang sebelumnya telah dilarutkan dengan cairan lain sehingga cairan tersebut membentuk dua lapisan yang tidak saling bercampur. Dua fase tersebut akan memiliki kelarutan yang berbeda setelah mencapai kesetimbangan konsentrasi. Waktu yang diperlukan untuk mencapai kesetimbangan konsentrasi dapat dipersingkat dengan mencampurkan dua fase dengan polaritas berbeda dalam labu pemisah. Senyawa yang bersifat polar akan tertarik pada pelarut polar, sedangkan senyawa yang bersifat non polar akan tertarik pada pelarut non polar (Houghton dan Raman, 1998). Golongan senyawa, seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan polifenol pada ekstrak etanol daun kaca piring (Hasyim, 2019) yang telah difraksinasi dapat terpisah berdasarkan polaritasnya.

2.6 Metode Uji Antibakteri

Beberapa tahun terakhir, banyak dilakukan penelusuran dan pengembangan tentang metode uji aktivitas antibakteri. Tujuan dari pengembangan metode uji tersebut adalah untuk memudahkan dalam mengetahui potensi dari suatu agen antibakteri baru. Beberapa metode uji yang digunakan untuk mengevaluasi agen antibakteri baru, diantaranya metode difusi, dilusi, dan KLT bioautografi (Balouiri dkk., 2016).

2.6.1 Metode Difusi

Metode difusi merupakan metode yang sering digunakan dalam pengujian agen antibakteri baru yang berasal dari bahan alam. Metode difusi, secara luas banyak digunakan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari suatu tanaman terhadap beberapa patogen tertentu, seperti *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, dan *Neisseria meningitidis* dengan media kultur yang spesifik dan diinterpretasikan dalam nilai diameter zona hambat (Balouiri dkk., 2016). Metode difusi dapat dibedakan menjadi dua, yaitu metode difusi cakram dan sumuran.

a. Metode difusi cakram

Pada metode difusi cakram, media agar diinokulasi dengan inokulum standar dari mikroorganisme uji. Kertas cakram yang mengandung senyawa uji pada konsentrasi tertentu ditempatkan pada permukaan agar. Agen antibakteri akan berdifusi ke permukaan media agar dan menghambat perkembangbiakan bakteri uji sehingga diperoleh diameter zona hambat pertumbuhan bakteri. Keunggulan dari metode ini, antara lain pengerjaannya yang sederhana, memerlukan biaya yang rendah, dan menghasilkan pengukuran yang baik (Balouiri dkk., 2016).

b. Metode difusi sumuran

Sumuran adalah metode difusi lain yang banyak diterapkan. Proses pengujian pada metode sumuran sama seperti metode cakram. Media agar diinokulasi dengan menanam biakan bakteri di seluruh permukaan agar. Media agar yang telah ditanami mikroorganisme dilubangi secara aseptis

menggunakan *cork borer* dengan diameter sekitar 6-8 mm. Larutan ekstrak tanaman kemudian dimasukkan ke dalam sumuran dengan konsentrasi tertentu. Media agar diinkubasi pada lingkungan tertentu tergantung jenis mikroorganisme uji yang digunakan. Agen antibakteri, seperti ekstrak tanaman akan berdifusi menuju media agar dan menghambat pertumbuhan dari mikroorganisme uji (Balouiri dkk., 2016).

2.6.2 Metode Dilusi

Metode dilusi adalah metode yang paling tepat digunakan untuk menentukan nilai MIC (*minimum inhibitory concentration*) karena dapat memperkirakan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam *agar dilution* atau *broth medium* mikrodilusi dan makrodilusi. Metode ini dapat digunakan untuk menentukan aktivitas antimikroba secara *in vitro* terhadap bakteri dan jamur. Nilai MIC yang diperoleh didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji dan biasanya dinyatakan dalam satuan mg/mL atau mg/L (Balouiri dkk., 2016). Metode dilusi juga dapat digunakan untuk menentukan nilai *minimum bactericidal concentration* (MBC). MBC didefinisikan sebagai konsentrasi paling kecil dari zat antimikroba yang dibutuhkan untuk membunuh 99,9% inokulum akhir, yang dinyatakan dalam satuan CFU/mL.

2.6.3 Metode Bioautografi

KLT bioautografi merupakan metode yang menggabungkan antara KLT dengan deteksi biologis dan kimia. Beberapa penelitian tentang penyaringan ekstrak organik, terutama ekstrak tumbuhan untuk uji aktivitas antijamur dan antibakteri telah dilakukan dengan menggunakan metode ini (Balouiri dkk., 2016). Proses dalam metode bioautografi mirip seperti metode difusi agar, tetapi pada metode bioautografi senyawa yang diuji akan berdifusi ke dalam media agar yang diinokulasi pada lapisan kromatogram (Choma dan Grzelak, 2011). Metode bioautografi merupakan metode yang sederhana, efektif, murah, dan dapat memisahkan campuran yang kompleks. Metode ini juga dapat digunakan untuk

mendeteksi aktivitas antimikroba pada sampel lingkungan dan makanan serta dalam penemuan obat baru sebagai antimikroba (Balouiri dkk., 2016).



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring (*Gardenia augusta* Merr.) terhadap *Staphylococcus aureus* adalah *true experimental laboratories*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia, Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Bagian Biologi, dan Laboratorium Teknologi Sediaan Steril Bagian Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember mulai bulan April 2019 sampai November 2019.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring yaitu konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50%.

3.3.2 Variabel Terikat

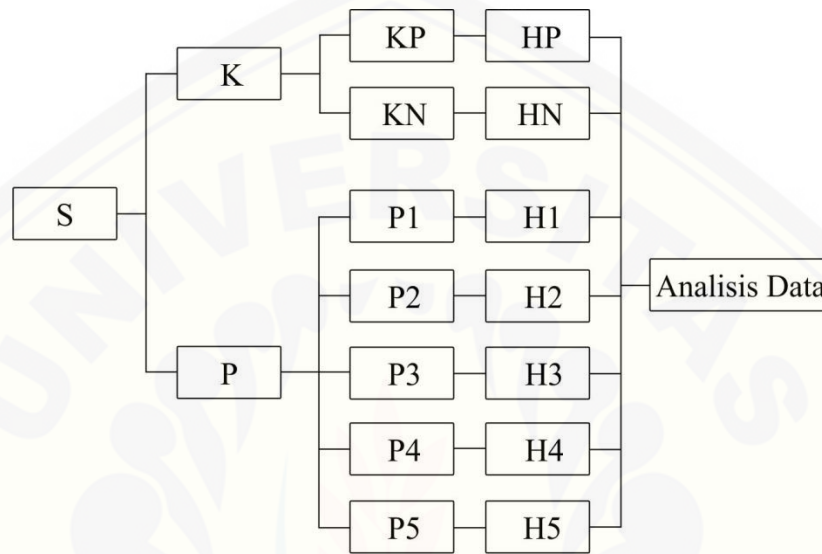
Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona hambat atau zona bening terhadap bakteri *S. aureus* pada media *Mueller-Hinton Agar* di sekeliling cakram setelah diinkubasi selama 18 jam dengan ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring pada konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50%.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring, pembuatan biakan bakteri *S. aureus*, jenis media, waktu dan suhu inkubasi, dan cara pengukuran uji aktivitas antibakteri.

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan pada penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring (*G. augusta*) terhadap *S. aureus* adalah *the post test control only group design* yang mencakup kelompok kontrol (kontrol positif dan negatif) dan kelompok perlakuan yang ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian uji aktivitas antibakteri

Keterangan:

- S = Sampel
- P = Kelompok perlakuan
- P₁₋₅ = Konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring 10, 20, 30, 40, dan 50%.
- H₁₋₅ = Hasil pengukuran ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring
- K = Kelompok kontrol
- KP = Kontrol positif gentamisin 10 µg
- HP = Hasil pengukuran kontrol positif
- KN = Kontrol negatif DMSO 10%
- HN = Hasil pengukuran kontrol negatif

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini meliputi:

1. Daun kaca piring yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu daun yang berwarna hijau tua dipilih dari beberapa tanaman yang telah berbunga dengan kondisi daun sehat, tidak berlubang dan layu. Daun diperoleh dari

Desa Sukoreno, Kecamatan Umbulsari, Kabupaten Jember, Jawa Timur pada daerah ketinggian 15 m dpl (Badan Pusat Statistika, 2018) ketika musim kemarau pada bulan April 2019.

2. Ekstrak etanol daun kaca piring merupakan ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Metode ekstraksi yang digunakan adalah remaserasi.
3. Pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi adalah air, etanol 96%, etil asetat, dan heksana.
4. Bakteri yang dipakai adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Bagian Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.
5. Zona hambat ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring adalah diameter dan luas daerah di sekeliling cakram yang tidak ditumbuhi bakteri *S. aureus* yang diukur menggunakan jangka sorong untuk diameter zona hambat dan *software ImageJ* untuk luas zona hambat.

3.6 Alat dan Bahan

Semua peralatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu neraca analitik, oven, vial, blender, erlenmeyer, *beaker glass*, pipet tetes, gelas ukur, autoklaf, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, gelas ekstrak, pipet volume, *spreader*, *hot plate*, bunsen, *software ImageJ*, batang pengaduk, loyang aluminium, *rotary evaporator*, *vortex*, *laminar air flow*, corong *Buchner*, inkubator, lemari es, mikropipet, *yellow tip*, *blue tip*, Standar Mc Farland 0,5.

Semua bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun kaca piring, bakteri *S. aureus*, etanol 96% (teknis), gentamisin 10 µg, akuades steril, *blank disc*, NaCl 0,9%, DMSO 10%, *Mueller-Hinton Agar* (MHA), *Nutrient Agar* (NA), alkohol 70%, *aluminium foil*, *plastic wrap*, kertas saring, kapas, kain kasa, etanol 96%, heksana (teknis), dan etil asetat (teknis).

3.7 Tahapan Penelitian

3.7.1 Identifikasi Tanaman

Identifikasi tanaman kaca piring dilakukan di Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember untuk memastikan bahwa pengambilan sampel tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah valid.

3.7.2 Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Kaca Piring

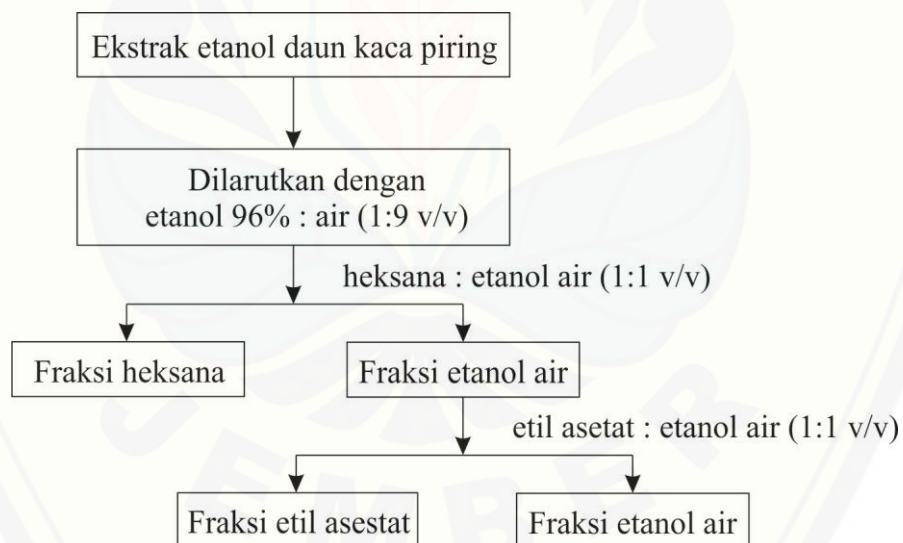
Daun kaca piring yang telah dipetik kemudian disortasi dan dipilih daun dengan kondisi yang sehat, tidak berlubang, dan layu. Daun hasil sortasi kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Setelah dilakukan proses pencucian, daun dibiarkan selama beberapa hari pada suhu kamar serta dijauhkan dari cahaya matahari langsung hingga air yang menempel pada daun menguap, daun kemudian dioven pada suhu 50°C hingga diperoleh simplisia kering. Simplisia tersebut kemudian digiling dan diayak hingga menjadi serbuk simplisia yang halus dan homogen.

3.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kaca Piring

Ekstraksi yang dilakukan yaitu menggunakan metode remaserasi. Simplisia serbuk dilarutkan dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10 di dalam maserator, kemudian didiamkan selama 3 hari dan sesekali dilakukan pengadukan. Larutan ekstrak kemudian difiltrasi menggunakan corong *Buchner* sehingga diperoleh residu dan maserat pertama. Maserat tersebut lalu dipekatkan pada suhu 50°C menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak diletakkan pada cawan dan diuapkan dalam lemari asam. Residu dari maserasi yang pertama kemudian dilarutkan kembali menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Pada tahapan selanjutnya sama seperti perlakuan larutan ekstrak yang pertama. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dicampur dengan ekstrak kental sebelumnya hingga homogen. Ekstrak kental tersebut kemudian dioven pada suhu 50°C hingga pelarutnya menguap. Rendemen yang diperoleh kemudian dihitung dan dimasukkan dalam gelas kaca untuk digunakan pada tahap selanjutnya.

3.7.4 Fraksinasi Ekstrak Etanol

Fraksinasi yang dilakukan yaitu menggunakan metode partisi cair-cair. Proses partisi dilakukan secara berulang hingga pelarut fraksi dalam keadaan bening. Ekstrak kental difraksinasi bertingkat menggunakan pelarut heksana dan etil asetat. Ditimbang sebanyak 9,6 gram ekstrak etanol daun kaca piring yang dilarutkan menggunakan etanol 96% dan air dengan perbandingan 1:9 sejumlah 160 mL diaduk hingga homogen dalam *beaker glass*. Larutan ekstrak dan pelarut fraksi dimasukkan ke dalam corong pisah berkapasitas 500 mL dengan perbandingan 1:1, sehingga jumlah pelarut keseluruhan sebanyak 320 mL. Campuran dikocok kurang lebih selama 15 menit dan didiamkan hingga terbentuk dua fase yang berbeda. Fase tersebut dipisahkan menjadi satu fraksi yang sama, kemudian diuapkan dalam lemari asam. Dihitung jumlah rendemen yang terbentuk dan dilakukan uji aktivitas antibakteri dari masing-masing fraksi. Skema proses fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Skema proses dari fraksinasi

3.7.5 Uji Antibakteri

1. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA) untuk penanaman dan pembiakan bakteri

Nutrient Agar ditimbang sebanyak 0,92 gram dilarutkan dalam 40 mL akuades dalam erlenmeyer, kemudian dipanaskan hingga larut sampai

media terlihat jernih. Media yang telah larut kemudian dituang ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 mL yang akan digunakan sebagai media biakan bakteri. Media NA yang telah berada di dalam tabung, disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media NA dimiringkan sebesar 30°-40° sehingga terbentuk media agar miring. Media NA tersebut kemudian disimpan di dalam lemari es sebelum digunakan.

2. Pembuatan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) untuk pengujian

Mueller-Hinton Agar ditimbang sebanyak 8,55 gram dilarutkan dalam 225 mL akuades dalam erlenmeyer, kemudian dipanaskan hingga larut sampai media terlihat jernih. Media dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 15 mL, lalu disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm dan disimpan dalam lemari es sebelum digunakan.

3. Pembuatan standar Mc Farland 0,5

H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL dicampur dengan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL hingga setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL, kemudian divortex hingga campuran menjadi homogen. Larutan standar Mc Farland tersebut diukur turbiditasnya menggunakan spektrofotometer UV-vis.

4. Pembiakan bakteri murni

Bakteri murni digoreskan secara aseptis menggunakan ose pada media NA miring dengan cara dihimpitkan pada bibir tabung reaksi di dekat nyala api dan di bawah *laminar air flow*. Tabung reaksi kemudian ditutup rapat dengan kapas dan *plastic wrap*, lalu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator.

5. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Suspensi bakteri *S. aureus* dibuat dengan teknik aseptis. Diambil 1-2 ose biakan bakteri *S. aureus* pada media agar miring, kemudian dimasukkan dalam tabung yang telah diisi NaCl 0,9% sebanyak 10 mL, lalu divortex sampai homogen. Turbiditas dari suspensi yang dihasilkan

dibandingkan dengan turbiditas dari standar Mc Farland 0,5 menggunakan spektrofotometer UV-vis dengan persentase sebesar 84%.

3.7.6 Sterilisasi Alat dan Bahan

Bahan dan alat yang digunakan, dibersihkan terlebih dahulu sebelum dilakukan proses sterilisasi. Semua alat dibungkus dengan kertas perkamen, kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

3.7.7 Pembuatan Larutan Kontrol

1. Kontrol negatif

Larutan kontrol negatif dibuat dengan mencampurkan akuades steril sebanyak 900 μL dan DMSO 100% sebanyak 100 μL sehingga terbentuk DMSO 10%.

2. Kontrol positif

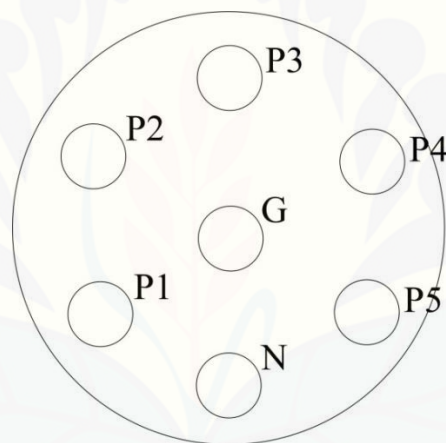
Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah gentamisin cakram dengan konsentrasi 10 μg dalam media *Mueller-Hinton Agar* (MHA).

3.7.8 Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji ekstrak dan fraksi dibuat dalam berbagai konsentrasi yang sama yaitu 10, 20, 30, 40, dan 50%. Larutan uji dibuat dari larutan induk konsentrasi 50% dengan menimbang ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring sebanyak 250 mg, kemudian dilarutkan dengan 50 μL larutan DMSO 100% lalu divortex sampai larut dan ditambahkan akuades sebanyak 450 μL kemudian divortex sampai homogen. Konsentrasi 10, 20, 30, dan 40%, dibuat dengan mengambil masing-masing sejumlah 30, 60, 90, dan 120 μL dari larutan induk 50% kemudian ditambahkan DMSO 10% hingga volume dari masing-masing larutan uji sebanyak 150 μL , lalu divortex sampai homogen. Larutan uji yang telah dibuat, diberi tanda terlebih dahulu untuk setiap konsentrasi yang berbeda sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut.

3.8 Tahap Pengujian Aktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi cakram. Sebanyak 15 μL larutan uji ekstrak, fraksi, dan kontrol negatif dimasukkan pada *blank disc*, kemudian didiamkan selama 24 jam agar larutan terserap secara merata dalam *blank disc*. Sebanyak 100 μL suspensi bakteri *S. aureus* yang turbiditasnya telah disesuaikan dengan Mc Farland, kemudian diratakan menggunakan *spreader* di atas permukaan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) pada cawan petri. *Blank disc* yang telah mengandung larutan uji ekstrak, fraksi, kontrol negatif, dan kontrol positif kemudian ditempelkan pada permukaan media MHA, setelah itu diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Desain metode difusi cakram pada cawan petri dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3 Desain metode difusi cakram pada cawan petri

Keterangan:

- P₁₋₅ = Larutan uji ekstrak etanol dan fraksi (heksana, etil asetat, dan etanol air) konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50%.
- G = Gentamisin cakram 10 μg
- N = DMSO 10%

3.9 Tahap Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan mengamati diameter dan luas zona hambat yang terbentuk mengelilingi cakram. Cara pengukuran diameter zona hambat dari uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kaca piring (*G. augusta*) terhadap *S.*

aureus dengan menggunakan jangka sorong, sedangkan untuk cara pengukuran luas zona hambat dengan menggunakan *software ImageJ*.

3.10 Analisis Data

Data hasil pengujian aktivitas ekstrak etanol dan fraksi daun kaca piring terhadap diameter dan luas zona hambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, diawali dengan melakukan uji normalitas dan homogenitas. Hasil uji menunjukkan data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan analisis menggunakan metode *One way ANOVA*. Data hasil analisis *One way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar sampel uji yang berbeda pada konsentrasi yang sama dan antar konsentrasi pada sampel uji yang sama, maka dilanjutkan dengan uji *LSD Post Hoc*. Setelah itu, dilakukan uji *T-Test* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pengukuran menggunakan diameter dan luas zona hambat pada tiap konsentrasi dengan sampel yang sama. Diameter zona hambat dikonversi terlebih dahulu menjadi luas zona hambat sebelum dilakukan uji *T-Test*. Perbedaan dapat dikatakan signifikan dengan tingkat kepercayaan yang dihasilkan sebesar 95% dan nilai $p < 0,05$.

3.11 Skrining Fitokimia Metode KLT

Skrining atau penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa golongan yang terkandung pada ekstrak etanol atau fraksi (heksana, etil asetat, dan etanol air) daun kaca piring yang menghasilkan aktivitas antibakteri paling tinggi. Skrining fitokimia metode KLT (Harborne, 1984) dilakukan sebagai berikut:

1. Identifikasi senyawa golongan alkaloid

Sebanyak 0,1 gram sampel ditimbang dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan sebanyak 2 mL HCl 2N. Tabung yang berisi sampel kemudian dipanaskan pada penangas air selama 2-3 menit sambil diaduk dan ditunggu hingga dingin. Setelah dingin, ditambahkan sebanyak 0,1 gram NaCl kemudian diaduk sampai homogen sebelum difiltrasi. Filtrat yang diperoleh

setelah penyaringan, kemudian ditambahkan sebanyak 2 mL HCl 2N. Selanjutnya, ditambahkan NH_4OH 28% hingga larutan menjadi basa. Kemudian, dipartisi dengan kloroform sebanyak 5 mL hingga terbentuk 2 lapisan yang berbeda. Lapisan bening yang terbentuk, diambil dan diuapkan sampai kering, lalu dilarutkan dengan beberapa tetes metanol. Setelah itu, ditotolkan pada fase diam (silica gel 60 F₂₅₄) dan dieluasi dengan fase gerak berupa metanol : etil asetat : air (2 : 9 : 2). Selanjutnya, diberi dragendorf untuk melihat penampak noda yang terbentuk. Senyawa golongan alkaloid ditunjukkan dengan adanya penampak noda yang berwarna jingga.

2. Identifikasi senyawa golongan saponin, terpenoid dan steroid

Ditimbang sebanyak 0,5 gram sampel dalam tabung reaksi, lalu ditambah HCl 2N sebanyak 5 mL dan ditutup menggunakan corong yang telah disumbat dengan kapas, kemudian dididihkan selama 2 jam supaya saponin mengalami hidrolisis. Setelah itu, didinginkan dan sampel dinetralkan dengan penambahan amonia. Sampel diekstraksi menggunakan 3 mL n-heksana sebanyak 3 kali, setelah itu diuapkan. Sampel ditotolkan pada fase diam (silica gel 60 F₂₅₄) dan dieluasi dengan fase gerak etil asetat : n-heksana (2 : 8). Hasil eluasi diberi penampak noda berupa anisaldehyda asam sulfat, kemudian dipanaskan. Perubahan warna merah ungu mengindikasikan adanya sapogenin. Sedangkan, identifikasi terpenoid dan steroid bebas dilakukan dengan sampel ditetesi etanol terlebih dahulu, lalu diaduk sampai larut. Larutan sampel ditotolkan pada fase diam (silica gel 60 F₂₅₄) dan dieluasi dengan fase gerak n-heksana: etil asetat (4 : 1). Hasil eluasi diberi penampak noda berupa anisaldehyda asam sulfat, kemudian dipanaskan. Adanya terpenoid atau steroid bebas ditunjukkan terjadinya perubahan warna menjadi merah ungu atau ungu.

3. Identifikasi senyawa golongan flavonoid

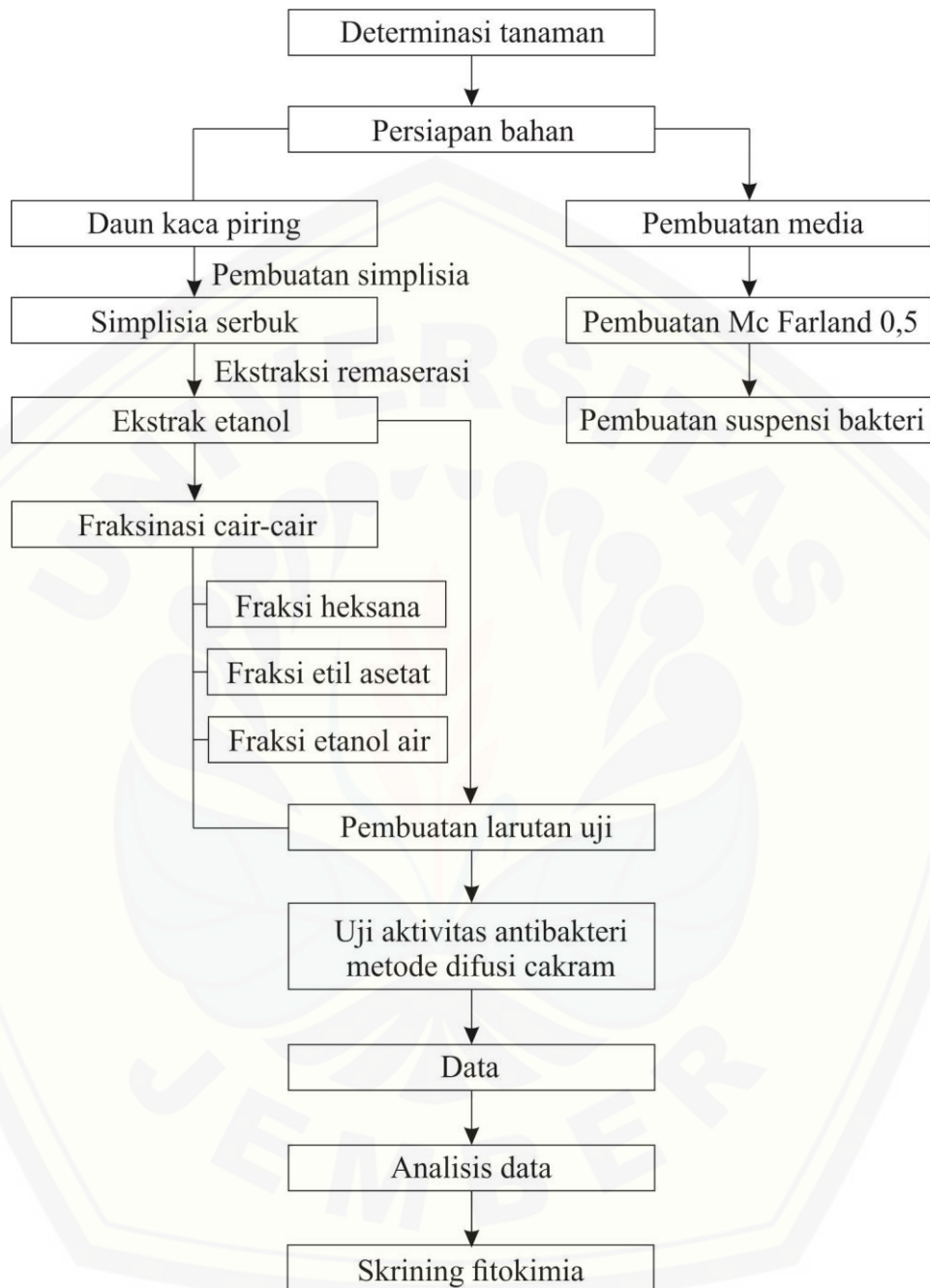
Sebanyak 0,1 gram sampel ditimbang dalam tabung reaksi, kemudian dipartisi dengan 3 mL n-heksana secara terus menerus hingga tidak berwarna. Sampel hasil partisi lalu dilarutkan menggunakan etanol. Larutan kemudian ditotolkan ditotolkan pada fase diam (silica gel 60 F₂₅₄) dan dieluasi dengan

fase gerak butanol : asam asetat glasial : air (4 : 1 : 5). Hasil eluasi diberi penampak noda berupa pereaksi sitrat borat atau uap amonia. Timbulnya noda berwarna kuning intensif mengindikasikan adanya flavonoid.

4. Identifikasi senyawa golongan polifenol

Sampel ditimbang dalam tabung reaksi sebanyak 0,1 gram, kemudian ditambahkan 30 mL akuades panas, dan diaduk hingga homogen dan dibiarkan hingga dingin. Sampel kemudian ditambahkan 3-4 tetes NaCl 10%, lalu diaduk dan difiltrasi. Filtrat kemudian ditotolkan pada fase diam (silica gel 60 F₂₅₄) dan dieluasi dengan fase gerak berupa etil asetat : kloroform (9 : 1). Diberi penampak noda FeCl₃ sampai timbul warna hitam yang menunjukkan adanya polifenol dalam sampel.

3.12 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 3.4 Skema prosedur penelitian

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dari penelitian diatas dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol, fraksi heksana, dan fraksi etil asetat daun kaca piring (*G. augusta*) pada konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50% b/v menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, tetapi fraksi etanol air tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* pada konsentrasi yang sama.
2. Aktivitas antibakteri paling tinggi dari daun kaca piring (*G. augusta*) terhadap *S. aureus* terlihat pada fraksi etil asetat.
3. Golongan senyawa yang terkandung pada fraksi etil asetat, antara lain alkaloid, terpenoid, dan flavonoid.
4. Penggunaan diameter dan luas zona hambat, menunjukkan adanya perbedaan aktivitas antibakteri.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang:

1. Optimasi dan validasi terkait pemilihan sampel daun kaca piring yang digunakan untuk pengujian supaya menghasilkan aktivitas antibakteri yang tinggi.
2. Validasi kembali terkait penggunaan luas zona hambat sebagai interpretatif nilai zona hambat dari suatu agen antibakteri yang menggunakan metode uji difusi cakram.
3. Isolasi senyawa aktif pada fraksi etil asetat daun *G. augusta* yang berperan sebagai agen antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Azmi, S., S. Mohamed, N. Maimaiti, A. Ali, A. Muhammad, M. De Rosas-valera, J. Encluna, R. Mohamed, B. Wibowo, K. Komaryani, dan C. Roberts. 2016. Assessing the burden of pneumonia using administrative data from Malaysia, Indonesia, and the Philippines. *International Journal of Infectious Diseases*. 49:87–93.
- Azwanida. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants Azwanida*. 4(3):3–8.
- Badal, S. dan R. Delgoda. 2017. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. Netherlands: Elsevier Inc. Hal 233-266.
- Badan Pusat Statistika. 2018. *Kecamatan Umbulsari Dalam Angka 2018*. Jember: Badan Pusat Statistika Kabupaten Jember. Hal 2.
- Bagnoli, F., R. Rappuoli, dan G. Grandi. 2017. *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*. Switzerland: Springer International Publishing. Hal 1-2.
- 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, G. F., K. C. Carroll, J. S. Butel, S. A. Morse, dan T. A. Mietzner. 2013. *Jawetz, Melnick and Adelberg's: Medical Microbiology 26th Edition*. United States of America: McGraw-Hill Education. Hal 199-203.
- Carroll, K. C., J. Butel, dan S. Morse. 2015. *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27th Edition*. New York: McGraw-Hill Education. Hal 206-207.
- Chaichana, J., W. Niwatananun, S. Vejabhikul, S. Somna, dan S. Chansakaow. 2009. Volatile constituents and biological activities of *Gardenia jasminoides*. *Journal of Health Research*. 23(3):141–145.
- Choma, I. M. dan E. M. Grzelak. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1218(19):2684–2691.
- Chowdhury, A., S. Azam, M. A. Jainul, K. O. Faruq, dan A. Islam. 2014. Antibacterial activities and in vitro anti-inflammatory (membrane stability) properties of methanolic extracts of *Gardenia coronaria* leaves.

International Journal of Microbiology. 1(1):1–6.

Ciocan, I. D. dan I. I. Bara. 2007. Plant product as antimicrobial agents. *Secțiunea Genetică Și Biologie Moleculară*. 8:151–156.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), C. and L. S. I. 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard 7th edition. *CLSI Document M02-A11*. 32(1):1–58.

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4):564–582.

Cushnie, T. P. T., B. Cushnie, dan A. J. Lamb. 2014. Alkaloids : an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 44(5):377–386.

Dalimartha, S. 2003. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 3*. Jakarta: Trubus Agriwidya. Hal 30-31.

de Brito, R. C., G. N. da Silva, T. C. Farias, dan S. B. Ferreira. 2017. Standardization of the safety level of the use of dms0 in viability assays in bacterial cells. *International Conference Series on Multidisciplinary Sciences*. 3:1–6.

Dombrowski, J. C. dan L. G. Winston. 2008. Clinical failures of appropriately-treated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Infection*. 57(2):110–115.

Dunn, L. 2005. Pneumonia: classification, diagnosis and nursing management. *Nursing Standard*. 19(42):50–54.

Farhadi, F., B. Khameneh, M. Iranshahi, dan M. Iranshahy. 2018. Antibacterial activity of flavonoids and their structure-activity relationship: an update review. *Phytotherapy Research*. 33(1):13–40.

Faruq, A. Al, M. Ibrahim, M. M. U. Chowdhury, M. R. Haque, dan M. A. Rashid. 2017. Pharmacological and biological activities of different fractions ethanol extracts of *Gardenia coronaria* Buch. Ham. leaves. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*. 20(2):139–147.

Farzinebrahimi, R., R. M. Taha, K. Rashid, dan J. S. Yaacob. 2014. The effect of various media and hormones via suspension culture on secondary metabolic activities of (cape jasmine) *Gardenia jasminoides* Ellis. *The Scientific World Journal*. 1–7.

FIRS, (Forum of International Respiratory Societies). 2017. *The Global Impact of*

- Respiratory Disease 2nd Edition*. Sheffield: European Respiratory Society. Hal 16-19.
- Harborne, J. B. 1984. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis 2nd Edition*. New York: Chapman and Hall. Hal 39-45, 55-60, 120-128, 192-201.
- Hasyim, S. N. A. 2019. Skrinig Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kaca Piring (*Gardenia augusta* Merr.) Terhadap *Escherichia coli*. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Hennekinne, J. A. 2018. *Staphylococcus Aureus as a Leading Cause of Foodborne Outbreaks World Wide*. Netherlands: Elsevier Inc. Hal 129-146.
- Houghton, P. J. dan A. Raman. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. London: Springer Science Business Media. Hal 54-58.
- Kasper, D. L., S. L. Lauser, L. Jameson, A. S. Fauci, D. L. Longo, dan J. Loscalzo. 2015. *Harrison's Principles of Internal Medicine 19th Edition*. United States of America: McGraw-Hill Education. Hal 803-804.
- Kementerian Kesehatan RI. 2010. *Pneumonia Pada Balita*. Jakarta: Buletin Jendela Epidemiologi. Hal 17.
- Kementerian Kesehatan RI. 2018. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2017*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI. Hal 170-171.
- Khalil, A. M., O. M. Sabry, H. I. Elaskary, dan S. M. Elzalabani. 2018. Advantages of Liquid/Solid over Liquid/Liquid Extraction in Isolation of Verbascoside and Other Phenolics from Clerodendrum Inerme. *Globally Recognized Egyptian Pharmaceutical Ingredients-A National Priority*. Cairo : 9th International Scientific Conferen. April 25th-26th.
- Kobayashi, K. D. dan A. J. Kaufman. 2006. Common Gardenia. *Ornamental and Flowers*. 32(1):1-7.
- Kochanek, K. D., S. L. Murphy, J. Xu, E. Arias, dan D. Ph. 2019. National vital statistics reports deaths: final data for 2017. *National Vital Statistics Reports*. 68(9):1-76.
- Liu, X. dan H. Lou. 2007. Synthesis of monoterpene alkaloid derivatives from the iridoid glucoside geniposide. *Natural Product Research*. 21(13):1157-1164.
- Pandey, A. dan S. Tripathi. 2014. Concept of standardization, extraction and prephytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2(5):115-119.

- PDPI, (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia). 2003. *Pneumonia Komuniti: Pedoman Diagnosis Dan Penatalaksanaan Di Indonesia*. Jakarta: Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. Hal 2-15.
- Prabowo, F. I. dan I. Habib. 2012. Identifikasi pola kepekaan dan jenis bakteri pada pasien infeksi saluran kemih di rumah sakit PKU Muhammadiyah Yogyakarta. *Mutiara Medika*. 12(2):93–101.
- Pushpavathi, P. Kekuda, Raghavendra, Shilpa, T. Petkar, dan A. Siddiqha. 2017. Antimicrobial, antiradical and insecticidal activity of *Gardenia gummifera* L.F. (rubiaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 9(10):256–272.
- Romulo, A., E. A. M. Zuhud, dan J. Rondevaldova. 2018. Screening of in vitro antimicrobial activity of plants used in traditional Indonesian medicine. *Pharmaceutical Biology*. 56(1):287–293.
- Rout, S., A. Jain, Choudary, dan Lopamudra. 2009. Plants in traditional medicinal system - future source on new drugs. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 1(1):1–23.
- Rowe, R. C., P. J. Sheskey, dan S. C. Owen. 2006. *Handbook of Pharmaceutical Excipients 5th Edition*. United Kingdom: Pharmaceutical Press. Hal 250-252.
- Sarker, S. D. 2012. *Natural Products Isolation 3th Edition*. Wolverhampton: Humana Press. hal 9.
- Sarker, S. D., Z. Latif, dan A. I. Gray. 2006. *Natural Products Isolation 2nd Edition*. New Jersey: Humana Press. Hal 36-37.
- Skiest, D. J. 2006. Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(2):655–656.
- Suwannakud, K. S., A. Chaveerach, dan R. Sudmoon. 2017. Chemical constituents of medicinal plants, *Gardenia elata*, *G. gjellerupii*, and *G. volkensii*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 9(3):293–296.
- Tabuti, J. R. S., K. A. Lye, dan S. S. Dhillion. 2003. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *Journal of Ethnopharmacology*. 88(1):19–44.
- Tamilselvi, K., S. P. Anand, dan A. Doss. 2017. Antimicrobial activity of *gardenia latifolia* ait. *International Journal of Current Advanced Research*. 6(12):7919–7922.

- Tertel, M. L., J. P. Christopher, L. Martin, dan M. A. Russell. 2017. *Performance Standards for Antimicrobial, 27th Edition. CLSI Supplement M100*. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute. Hal 62.
- Todar, K. 2008. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. <http://textbookofbacteriology.net/staph.html> [Diakses pada 30 September, 2019]
- Torok, M. E., E. Moran, dan F. J. Cooke. 2017. *Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology 2nd Edition*. United Kingdom: Oxford University Press. Hsl 234.
- Tuna, M. R., B. J. Kepel, dan M. A. Leman. 2015. Uji daya hambat ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi*. 4(4):65–70.
- USDA, (United State Department of Agriculture). 2000. *Gardenia jasminoides* J. Ellis. <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=GAJA> [Diakses pada 12 Desember, 2019]
- Utami, K. S. 2014. *Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga Chlorella Sp. Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Wang, L., S. Liu, X. Zhang, J. Xing, Z. Liu, dan F. Song. 2016. A strategy for identification and structural characterization of compounds from *Gardenia jasminoides* by integrating macroporous resin column chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with ion-mobility spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1–11.
- Wulandari, T., I. Listiana, dan B. Sugeng. 2013. Daya bunuh infusa daun kacapiring (*Gardenia augusta*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus salivarius*. *Oral Biology Dental Journal*. 5(1):50–54.
- Xiao, W., S. Li, S. Wang, dan C. T. Ho. 2016. Chemistry and bioactivity of *Gardenia jasminoides*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 25(1):43–61.
- Yang, L. I., Z. Zhen, Z. Jiawei, dan Z. Ye. 2016. A sensitive standardized method for determining antimicrobial activity of iridoid glycoside geniposide and its aglycone. *Sciencepaper Online*. 1–4.
- Yuan, H., Q. Ma, L. Ye, dan G. Piao. 2016. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*. 21(599):1–18.

Zhang, Q. W., L. G. Lin, dan W. C. Ye. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural product: a comprehensi review. *Chinese Medicine*. 13(20):1–26.



LAMPIRAN

Lampiran A. Hasil Identifikasi Tanaman Kaca Piring (*Gardenia augusta*)

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: 10/PL17.3.1.02/LL/2019

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Farmasi Universitas Jember No: 901/UN25.13/LL/2019 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Mohammad Thahir; I Wayan Seniarta; Siti Nur Azizah Hasyim
NIM : 152210101135; 152210101118; 152210101127
Jur/Fak/PT : Fakultas Farmasi/ Universitas Jember

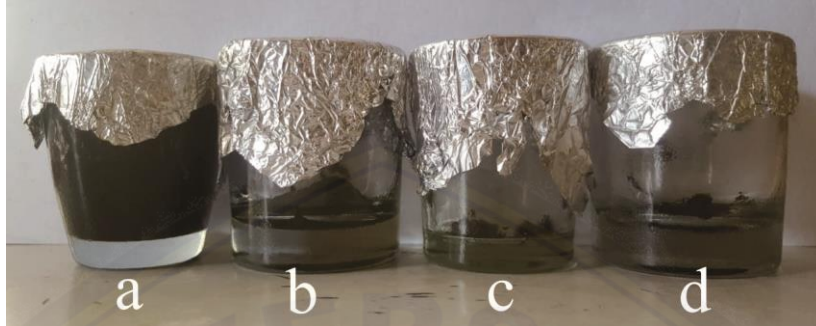
maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub Kelas: Asteridae; Ordo: Rubiales; Famili: Rubiaceae; Genus: Gardenia; Spesies: Gardenia augusta, Merr.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.



Jember, 11 April 2019
Kepala Laboratorium Tanaman
[Signature]
I. Lilik Mastuti, MP
NIP. 195808201987032001

Lampiran B. Perhitungan Rendemen Ekstrak dan Fraksi



Keterangan : (a) Ekstrak etanol, (b) fraksi etanol air, (c) fraksi etil asetat, dan (d) fraksi heksana dari daun kaca piring

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

a. Ekstrak etanol

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{40,52 \text{ g}}{200,05 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 20,254\% \end{aligned}$$

b. Fraksi heksana

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{0,54 \text{ g}}{9,60 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 5,625\% \end{aligned}$$

c. Fraksi etil asetat

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{0,70 \text{ g}}{9,60 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 7,292\% \end{aligned}$$

d. Fraksi etanol air

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{6,06 \text{ g}}{9,60 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 63,125\% \end{aligned}$$

Lampiran C. Perhitungan Larutan Uji Ekstrak, Fraksi, dan DMSO 10% Sebagai Kontrol Negatif

a. Perhitungan DMSO 10% sebagai kontrol negatif

Larutan kontrol negatif dibuat dengan mencampurkan aquades steril sebanyak 900 μL dan DMSO 100% sebanyak 100 μL sehingga terbentuk DMSO 10%.

b. Pembuatan larutan uji ekstrak etanol daun kaca piring (*G. augusta*) konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50%

- Pembuatan larutan induk 50% (b/v)

$$\begin{aligned}\text{Konsetrasi larutan induk} &= \frac{250 \text{ mg}}{500 \mu\text{L DMSO 10\%}} \times 100\% \\ &= 50\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 40% (v/v)

$$\begin{aligned}50\% \times \text{volume yang dibutuhkan} &= 40\% \times 150 \mu\text{L} \\ \text{volume yang dibutuhkan} &= 120 \mu\text{L ad } 150 \mu\text{L DMSO 10\%}\end{aligned}$$

- Konsentrasi 30% (v/v)

$$\begin{aligned}50\% \times \text{volume yang dibutuhkan} &= 30\% \times 150 \mu\text{L} \\ \text{volume yang dibutuhkan} &= 90 \mu\text{L ad } 150 \mu\text{L DMSO 10\%}\end{aligned}$$

- Konsentrasi 20% (v/v)

$$\begin{aligned}50\% \times \text{volume yang dibutuhkan} &= 20\% \times 150 \mu\text{L} \\ \text{volume yang dibutuhkan} &= 60 \mu\text{L ad } 150 \mu\text{L DMSO 10\%}\end{aligned}$$

- Konsentrasi 10% (v/v)

$$\begin{aligned}50\% \times \text{volume yang dibutuhkan} &= 10\% \times 150 \mu\text{L} \\ \text{volume yang dibutuhkan} &= 30 \mu\text{L ad } 150 \mu\text{L DMSO 10\%}\end{aligned}$$

c. Pembuatan larutan uji fraksi heksana daun kaca piring (*G. augusta*) konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50%

- Pembuatan larutan induk 50% (b/v)

$$\begin{aligned}\text{Konsetrasi larutan induk} &= \frac{250 \text{ mg}}{500 \mu\text{L DMSO 10\%}} \times 100\% \\ &= 50\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 40% (v/v)
50% x volume yang dibutuhkan = 40% x 150 μ L
volume yang dibutuhkan = 120 μ L ad 150 μ L DMSO 10%
 - Konsentrasi 30% (v/v)
50% x volume yang dibutuhkan = 30% x 150 μ L
volume yang dibutuhkan = 90 μ L ad 150 μ L DMSO 10%
 - Konsentrasi 20% (v/v)
50% x volume yang dibutuhkan = 20% x 150 μ L
volume yang dibutuhkan = 60 μ L ad 150 μ L DMSO 10%
 - Konsentrasi 10% (v/v)
50% x volume yang dibutuhkan = 10% x 150 μ L
volume yang dibutuhkan = 30 μ L ad 150 μ L DMSO 10%
- d. Pembuatan larutan uji fraksi etil asetat daun kaca piring (*G. augusta*) konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50%
- Pembuatan larutan induk 50% (b/v)
Konsetrasi larutan induk = $\frac{250 \text{ mg}}{500 \mu\text{L DMSO 10\%}} \times 100\%$
= 50%
 - Konsentrasi 40% (v/v)
50% x volume yang dibutuhkan = 40% x 150 μ L
volume yang dibutuhkan = 120 μ L ad 150 μ L DMSO 10%
 - Konsentrasi 30% (v/v)
50% x volume yang dibutuhkan = 30% x 150 μ L
volume yang dibutuhkan = 90 μ L ad 150 μ L DMSO 10%
 - Konsentrasi 20% (v/v)
50% x volume yang dibutuhkan = 20% x 150 μ L
volume yang dibutuhkan = 60 μ L ad 150 μ L DMSO 10%
 - Konsentrasi 10% (v/v)
50% x volume yang dibutuhkan = 10% x 150 μ L
volume yang dibutuhkan = 30 μ L ad 150 μ L DMSO 10%

e. Pembuatan larutan uji fraksi etanol air daun kaca piring (*G. augusta*) konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50%

- Pembuatan larutan induk 50% (b/v)

$$\begin{aligned}\text{Konsetrasi larutan induk} &= \frac{250 \text{ mg}}{500 \mu\text{L DMSO 10\%}} \times 100\% \\ &= 50\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 40% (v/v)

$$50\% \times \text{volume yang dibutuhkan} = 40\% \times 150 \mu\text{L}$$

$$\text{volume yang dibutuhkan} = 120 \mu\text{L ad } 150 \mu\text{L DMSO 10\%}$$

- Konsentrasi 30% (v/v)

$$50\% \times \text{volume yang dibutuhkan} = 30\% \times 150 \mu\text{L}$$

$$\text{volume yang dibutuhkan} = 90 \mu\text{L ad } 150 \mu\text{L DMSO 10\%}$$

- Konsentrasi 20% (v/v)

$$50\% \times \text{volume yang dibutuhkan} = 20\% \times 150 \mu\text{L}$$

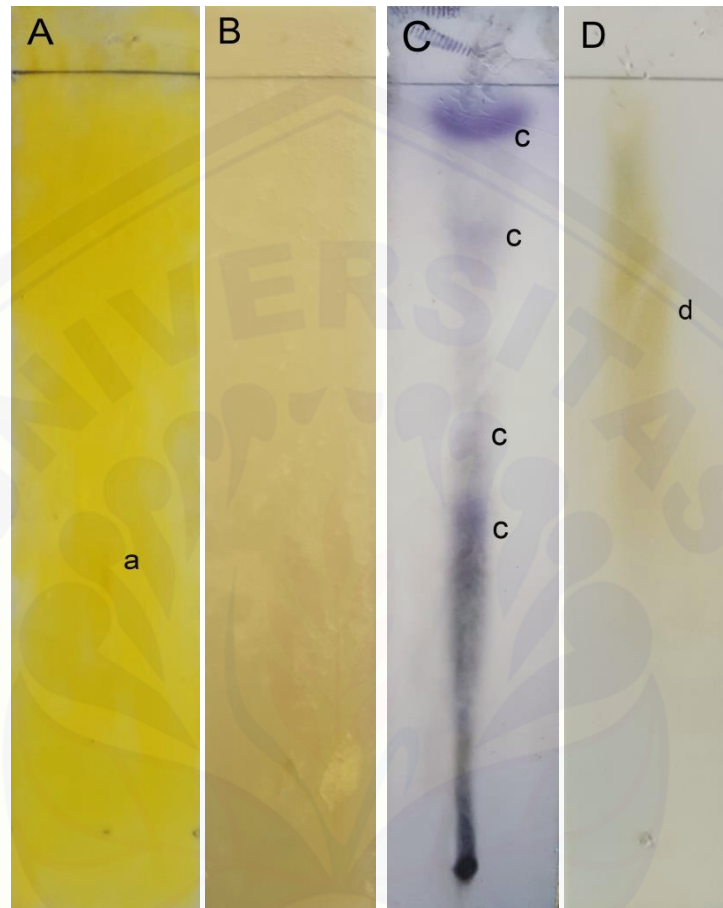
$$\text{volume yang dibutuhkan} = 60 \mu\text{L ad } 150 \mu\text{L DMSO 10\%}$$

- Konsentrasi 10% (v/v)

$$50\% \times \text{volume yang dibutuhkan} = 10\% \times 150 \mu\text{L}$$

$$\text{volume yang dibutuhkan} = 30 \mu\text{L ad } 150 \mu\text{L DMSO 10\%}$$

Lampiran D. Hasil Penapisan Fitokimia Fraksi Etil Asestat dengan Metode KLT



Keterangan: (A) Alkaloid dengan penampak noda (a), muncul noda berwarna jingga; (B) pilifenol, tidak muncul penampak noda; (C) terpenoid dengan penampak noda (c), muncul noda berwarna ungu; (D) flavonoid dengan penampak noda (d), muncul noda berwarna kuning yang kurang intensif

Lampiran E. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak dan Fraksi Daun Kaca Piring terhadap Bakteri *S. aureus*

Sampel	Replikasi	Diameter zona hambat ekstrak etanol (mm)					K+	K-
		10%	20%	30%	40%	50%		
Ekstrak etanol	1	6,37	7,15	7,68	8,51	9,29	29,23	0,00
	2	6,44	7,03	7,60	8,45	9,25	29,27	0,00
	3	6,55	7,28	7,72	8,69	9,49	28,57	0,00
	Rerata	6,45	7,16	7,67	8,55	9,34	29,02	0,00
	SD	0,09404	0,12335	0,06110	0,12490	0,13239	0,39487	0,00000
	KV	1,45731	1,72381	0,79697	1,46025	1,41707	1,36059	0,00000
Fraksi heksana	1	6,63	7,08	7,83	8,79	9,42	28,79	0,00
	2	6,67	7,33	7,91	8,69	9,85	28,94	0,00
	3	6,59	7,19	7,76	8,41	9,68	29,58	0,00
	Rerata	6,63	7,20	7,83	8,63	9,65	29,11	0,00
	SD	0,03672	0,12185	0,07688	0,20070	0,21503	0,42022	0,00000
	KV	0,55371	1,69214	0,98149	2,32534	2,22853	1,44377	0,00000
Fraksi etil asetat	1	8,27	9,77	10,49	11,27	12,32	28,24	0,00
	2	8,69	9,41	10,39	11,58	12,74	28,65	0,00
	3	8,51	9,35	10,34	11,45	12,25	26,90	0,00
	Rerata	8,49	9,51	10,40	11,43	12,44	27,93	0,00
	SD	0,21389	0,22716	0,07493	0,15724	0,26385	0,91395	0,00000
	KV	2,51963	2,38944	0,72019	1,37559	2,12133	3,27242	0,00000
Fraksi etanol air	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	28,92	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	29,15	0,00
	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	28,29	0,00
	Rerata	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	28,79	0,00
	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,44288	0,00000
	KV	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	1,53850	0,00000

Lampiran F. Hasil Pengukuran Luas Zona Hambat Ekstrak dan Fraksi Daun Kaca Piring terhadap Bakteri *S. aureus*

Sampel	Replikasi	Luas zona hambat (mm ²)					K+	K-
		10%	20%	30%	40%	50%		
Ekstrak etanol	1	39,845	46,786	59,162	71,553	83,028	596,614	0,00
	2	39,466	47,422	58,752	69,839	82,091	596,514	0,00
	3	39,007	47,36	58,008	71,905	83,411	594,134	0,00
	Rerata	39,44	47,19	58,64	71,10	82,84	595,75	0,00
	SD	0,41964	0,35067	0,58500	1,10529	0,67910	1,40385	0,00000
	KV	1,06400	0,74311	0,99760	1,55459	0,81974	0,23564	0,00000
Fraksi heksana	1	37,082	43,257	48,364	53,567	82,119	627,395	0,00
	2	37,682	41,756	49,385	55,966	83,968	625,39	0,00
	3	36,536	42,288	51,371	54,879	80,088	626,943	0,00
	Rerata	37,10	42,43	49,71	54,80	82,06	626,91	0,00
	SD	0,57321	0,76103	1,52909	1,20126	1,94071	1,34401	0,00000
	KV	1,54505	1,79345	3,07623	2,19192	2,36504	0,21439	0,00000
Fraksi etil asetat	1	89,28	111,293	136,381	160,758	181,663	620,014	0,00
	2	90,692	111,455	134,288	160,037	181,294	618,857	0,00
	3	89,372	111,973	135,898	161,567	181,411	620,884	0,00
	Rerata	89,78	111,57	135,52	160,79	181,46	619,92	0,00
	SD	0,79000	0,35519	1,09590	0,76542	0,18857	1,01688	0,00000
	KV	0,87992	0,31835	0,80865	0,47605	0,10392	0,16403	0,00000
Fraksi etanol air	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	529.649	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	528.368	0,00
	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	529.459	0,00
	Rerata	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	529.16	0,00
	SD	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0.69130	0,00000
	KV	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0.13064	0,00000

Lampiran G. Hasil Analisis Data Statistik Diameter Zona Hambat Ekstrak dan Fraksi Daun Kaca Piring

1. Analisis antar konsentrasi pada sampel yang sama

Tests of Normality^{b,c,d,e,f,g,h,i,j}

	Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekstrak	10%	.225	3	.	.984	3	.756
	20%	.178	3	.	.999	3	.956
	30%	.253	3	.	.964	3	.637
	40%	.292	3	.	.923	3	.463
	50%	.328	3	.	.871	3	.298
Heksana	10%	.175	3	.	1.000	3	1.000
	20%	.198	3	.	.995	3	.868
	30%	.184	3	.	.999	3	.927
	40%	.286	3	.	.930	3	.490
	50%	.222	3	.	.986	3	.770
Etilasetat	10%	.204	3	.	.993	3	.843
	20%	.337	3	.	.855	3	.253
	30%	.253	3	.	.964	3	.637
	40%	.209	3	.	.991	3	.823
	50%	.337	3	.	.855	3	.253

Keterangan:

b, c, d, e, f, g, h, i, j = fraksi etanol air pada konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50% *diabaikan* karena tidak menghasilkan zona hambat

Hasil *Test of Normality Shapiro-Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ekstrak	1.997	5	12	.151
Heksana	2.884	5	12	.062
Etilasetat	2.945	5	12	.058
Etanolair	.	5	.	.

Keterangan:

Fraksi etanol air tidak ada nilai *p value* karena tidak menghasilkan zona hambat

Hasil *Test of Homogeneity of Variance* menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ekstrak	Between Groups	168.968	5	33.794	3394.439	.000
	Within Groups	.119	12	.010		
	Total	169.087	17			
Heksana	Between Groups	176.537	5	35.307	1950.090	.000
	Within Groups	.217	12	.018		
	Total	176.755	17			
Etilasetat	Between Groups	302.207	5	60.441	1847.420	.000
	Within Groups	.393	12	.033		

Total		302.600	17			
Etanolair	Between Groups	.000	5	.000		
	Within Groups	.000	12	.000		
Total		.000	17			

Keterangan:

Fraksi etanol air tidak ada nilai *p value* karena tidak menghasilkan zona hambat
 Nilai p yang diperoleh adalah $p < 0,05$ yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan pada nilai zona hambat pada setiap konsentrasi uji dari masing-masing sampel

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Ekstrak	10%	20%	-.70000	.08147	.000	-.8775	-.5225
		30%	-1.21333	.08147	.000	-1.3908	-1.0358
		40%	-2.09667	.08147	.000	-2.2742	-1.9192
		50%	-2.89000	.08147	.000	-3.0675	-2.7125
		Kontrol negatif	6.45333	.08147	.000	6.2758	6.6308
	20%	10%	.70000	.08147	.000	.5225	.8775
		30%	-.51333	.08147	.000	-.6908	-.3358
		40%	-1.39667	.08147	.000	-1.5742	-1.2192
		50%	-2.19000	.08147	.000	-2.3675	-2.0125
		Kontrol negatif	7.15333	.08147	.000	6.9758	7.3308
	30%	10%	1.21333	.08147	.000	1.0358	1.3908
		20%	.51333	.08147	.000	.3358	.6908
		40%	-.88333	.08147	.000	-1.0608	-.7058
		50%	-1.67667	.08147	.000	-1.8542	-1.4992
		Kontrol negatif	7.66667	.08147	.000	7.4892	7.8442
	40%	10%	2.09667	.08147	.000	1.9192	2.2742
		20%	1.39667	.08147	.000	1.2192	1.5742
		30%	.88333	.08147	.000	.7058	1.0608
		50%	-.79333	.08147	.000	-.9708	-.6158
		Kontrol negatif	8.55000	.08147	.000	8.3725	8.7275
50%	10%	2.89000	.08147	.000	2.7125	3.0675	
	20%	2.19000	.08147	.000	2.0125	2.3675	
	30%	1.67667	.08147	.000	1.4992	1.8542	
	40%	.79333	.08147	.000	.6158	.9708	
	Kontrol negatif	9.34333	.08147	.000	9.1658	9.5208	
Kontrol negatif	10%	-6.45333	.08147	.000	-6.6308	-6.2758	
	20%	-7.15333	.08147	.000	-7.3308	-6.9758	
	30%	-7.66667	.08147	.000	-7.8442	-7.4892	
	40%	-8.55000	.08147	.000	-8.7275	-8.3725	
	50%	-9.34333	.08147	.000	-9.5208	-9.1658	
Heksana	10%	20%	-.57000	.10987	.000	-.8094	-.3306
		30%	-1.20333	.10987	.000	-1.4427	-.9640
		40%	-2.00000	.10987	.000	-2.2394	-1.7606

		50%	-3.02000 ⁺	.10987	.000	-3.2594	-2.7806
		Kontrol negatif	6.63000 ⁺	.10987	.000	6.3906	6.8694
20%		10%	.57000 ⁺	.10987	.000	.3306	.8094
		30%	-.63333 ⁺	.10987	.000	-.8727	-.3940
		40%	-1.43000 ⁺	.10987	.000	-1.6694	-1.1906
		50%	-2.45000 ⁺	.10987	.000	-2.6894	-2.2106
		Kontrol negatif	7.20000 ⁺	.10987	.000	6.9606	7.4394
30%		10%	1.20333 ⁺	.10987	.000	.9640	1.4427
		20%	.63333 ⁺	.10987	.000	.3940	.8727
		40%	-.79667 ⁺	.10987	.000	-1.0360	-.5573
		50%	-1.81667 ⁺	.10987	.000	-2.0560	-1.5773
		Kontrol negatif	7.83333 ⁺	.10987	.000	7.5940	8.0727
40%		10%	2.00000 ⁺	.10987	.000	1.7606	2.2394
		20%	1.43000 ⁺	.10987	.000	1.1906	1.6694
		30%	.79667 ⁺	.10987	.000	.5573	1.0360
		50%	-1.02000 ⁺	.10987	.000	-1.2594	-.7806
		Kontrol negatif	8.63000 ⁺	.10987	.000	8.3906	8.8694
50%		10%	3.02000 ⁺	.10987	.000	2.7806	3.2594
		20%	2.45000 ⁺	.10987	.000	2.2106	2.6894
		30%	1.81667 ⁺	.10987	.000	1.5773	2.0560
		40%	1.02000 ⁺	.10987	.000	.7806	1.2594
		Kontrol negatif	9.65000 ⁺	.10987	.000	9.4106	9.8894
Kontrol negatif		10%	-6.63000 ⁺	.10987	.000	-6.8694	-6.3906
		20%	-7.20000 ⁺	.10987	.000	-7.4394	-6.9606
		30%	-7.83333 ⁺	.10987	.000	-8.0727	-7.5940
		40%	-8.63000 ⁺	.10987	.000	-8.8694	-8.3906
		50%	-9.65000 ⁺	.10987	.000	-9.8894	-9.4106
Etilasetat	10%	20%	-1.02000 ⁺	.14769	.000	-1.3418	-.6982
		30%	-1.91667 ⁺	.14769	.000	-2.2384	-1.5949
		40%	-2.94333 ⁺	.14769	.000	-3.2651	-2.6216
		50%	-3.94667 ⁺	.14769	.000	-4.2684	-3.6249
		Kontrol negatif	8.49000 ⁺	.14769	.000	8.1682	8.8118
	20%	10%	1.02000 ⁺	.14769	.000	.6982	1.3418
		30%	-.89667 ⁺	.14769	.000	-1.2184	-.5749
		40%	-1.92333 ⁺	.14769	.000	-2.2451	-1.6016
		50%	-2.92667 ⁺	.14769	.000	-3.2484	-2.6049
		Kontrol negatif	9.51000 ⁺	.14769	.000	9.1882	9.8318
	30%	10%	1.91667 ⁺	.14769	.000	1.5949	2.2384
		20%	.89667 ⁺	.14769	.000	.5749	1.2184
		40%	-1.02667 ⁺	.14769	.000	-1.3484	-.7049
		50%	-2.03000 ⁺	.14769	.000	-2.3518	-1.7082
		Kontrol negatif	10.40667 ⁺	.14769	.000	10.0849	10.7284
	40%	10%	2.94333 ⁺	.14769	.000	2.6216	3.2651
		20%	1.92333 ⁺	.14769	.000	1.6016	2.2451
		30%	1.02667 ⁺	.14769	.000	.7049	1.3484
		50%	-1.00333 ⁺	.14769	.000	-1.3251	-.6816

	Kontrol negatif	11.43333 ⁺	.14769	.000	11.1116	11.7551
50%	10%	3.94667 ⁻	.14769	.000	3.6249	4.2684
	20%	2.92667 ⁻	.14769	.000	2.6049	3.2484
	30%	2.03000 ⁻	.14769	.000	1.7082	2.3518
	40%	1.00333 ⁻	.14769	.000	.6816	1.3251
	Kontrol negatif	12.43667 ⁺	.14769	.000	12.1149	12.7584
Kontrol negatif	10%	-8.49000 ⁻	.14769	.000	-8.8118	-8.1682
	20%	-9.51000 ⁻	.14769	.000	-9.8318	-9.1882
	30%	10.40667 ⁻	.14769	.000	-10.7284	-10.0849
	40%	11.43333 ⁺	.14769	.000	-11.7551	-11.1116
	50%	12.43667 ⁻	.14769	.000	-12.7584	-12.1149

Keterangan :

Jika nilai sig < 0,05 maka dapat dikatakan ada perbedaan yang bermakna

Jika nilai sig > 0,05 maka dapat dikatakan tidak ada perbedaan atau sama

2. Analisis antar sampel pada konsentrasi yang sama

Tests of Normality^{a,b,c,d,t,g,h,i,j}

	Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^e			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsentrasi_10	Ekstrak Etanol	.225	3	.	.984	3	.756
	Fraksi Heksana	.175	3	.	1.000	3	1.000
	Fraksi Etil Asetat	.204	3	.	.993	3	.843
Konsentrasi_20	Ekstrak Etanol	.198	3	.	.995	3	.868
	Fraksi Heksana	.198	3	.	.995	3	.868
	Fraksi Etil Asetat	.337	3	.	.855	3	.253
Konsentrasi_30	Ekstrak Etanol	.253	3	.	.964	3	.637
	Fraksi Heksana	.184	3	.	.999	3	.927
	Fraksi Etil Asetat	.253	3	.	.964	3	.637
Konsentrasi_40	Ekstrak Etanol	.292	3	.	.923	3	.463
	Fraksi Heksana	.286	3	.	.930	3	.490
	Fraksi Etil Asetat	.209	3	.	.991	3	.823
Konsentrasi_50	Ekstrak Etanol	.328	3	.	.871	3	.298
	Fraksi Heksana	.222	3	.	.986	3	.770

Fraksi Etil Asetat	.337	3	.	.855	3	.253
--------------------	------	---	---	------	---	------

Keterangan:

b, c, d, e, f, g, h, i, j = fraksi etanol air pada konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50% *diabaikan* karena tidak menghasilkan zona hambat

Hasil *Test of Normality Shapiro-Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kontrol_negatif	.	3	.	.
Konsentrasi_10	3.338	3	8	.077
Konsentrasi_20	3.902	3	8	.055
Konsentrasi_30	2.131	3	8	.174
Konsentrasi_40	3.003	3	8	.095
Konsentrasi_50	3.977	3	8	.053

Hasil *Test of Homogeneity of Variance* menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kontrol_negatif	Between Groups	.000	3	.000	.	.
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	.000	11			
Konsentrasi_10	Between Groups	123.991	3	41.330	3048.334	.000
	Within Groups	.108	8	.014		
	Total	124.099	11			
Konsentrasi_20	Between Groups	153.233	3	51.078	2461.576	.000
	Within Groups	.166	8	.021		
	Total	153.399	11			
Konsentrasi_30	Between Groups	181.946	3	60.649	15960.199	.000

	Within Groups	.030	8	.004		
	Total	181.977	11			
Konsentrasi_40	Between Groups	220.859	3	73.620	3744.967	.000
	Within Groups	.157	8	.020		
	Total	221.017	11			
Konsentrasi_50	Between Groups	264.389	3	88.130	2637.302	.000
	Within Groups	.267	8	.033		
	Total	264.657	11			

Nilai p yang diperoleh adalah $p < 0,05$ yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan pada nilai zona hambat pada setiap konsentrasi uji dari masing-masing sampel

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Konsentrasi_10	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	-.17667	.09507	.100	-.3959	.0426
		Fraksi Etil Asetat	-2.03667*	.09507	.000	-2.2559	-1.8174
		Fraksi Etanol Air	6.45333*	.09507	.000	6.2341	6.6726
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	.17667	.09507	.100	-.0426	.3959
		Fraksi Etil Asetat	-1.86000*	.09507	.000	-2.0792	-1.6408
		Fraksi Etanol Air	6.63000*	.09507	.000	6.4108	6.8492
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	2.03667*	.09507	.000	1.8174	2.2559
		Fraksi Heksana	1.86000*	.09507	.000	1.6408	2.0792
		Fraksi Etanol Air	8.49000*	.09507	.000	8.2708	8.7092

	Fraksi Etanol Air	Ekstrak Etanol	-6.45333*	.09507	.000	-6.6726	-6.2341
		Fraksi Heksana	-6.63000*	.09507	.000	-6.8492	-6.4108
		Fraksi Etil Asetat	-8.49000*	.09507	.000	-8.7092	-8.2708
Konsentrasi _20	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	-.05000	.11762	.682	-.3212	.2212
		Fraksi Etil Asetat	-2.36000*	.11762	.000	-2.6312	-2.0888
		Fraksi Etanol Air	7.15000*	.11762	.000	6.8788	7.4212
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	.05000	.11762	.682	-.2212	.3212
		Fraksi Etil Asetat	-2.31000*	.11762	.000	-2.5812	-2.0388
		Fraksi Etanol Air	7.20000*	.11762	.000	6.9288	7.4712
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	2.36000*	.11762	.000	2.0888	2.6312
		Fraksi Heksana	2.31000*	.11762	.000	2.0388	2.5812
		Fraksi Etanol Air	9.51000*	.11762	.000	9.2388	9.7812
	Fraksi Etanol Air	Ekstrak Etanol	-7.15000*	.11762	.000	-7.4212	-6.8788
		Fraksi Heksana	-7.20000*	.11762	.000	-7.4712	-6.9288
		Fraksi Etil Asetat	-9.51000*	.11762	.000	-9.7812	-9.2388
Konsentrasi _30	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	-.16667*	.05033	.011	-.2827	-.0506
		Fraksi Etil Asetat	-2.74000*	.05033	.000	-2.8561	-2.6239
		Fraksi Etanol Air	7.66667*	.05033	.000	7.5506	7.7827
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	.16667*	.05033	.011	.0506	.2827
		Fraksi Etil Asetat	-2.57333*	.05033	.000	-2.6894	-2.4573

		Fraksi Etanol Air	7.83333*	.05033	.000	7.7173	7.9494
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	2.74000*	.05033	.000	2.6239	2.8561
		Fraksi Heksana	2.57333*	.05033	.000	2.4573	2.6894
		Fraksi Etanol Air	10.40667*	.05033	.000	10.2906	10.5227
	Fraksi Etanol Air	Ekstrak Etanol	-7.66667*	.05033	.000	-7.7827	-7.5506
		Fraksi Heksana	-7.83333*	.05033	.000	-7.9494	-7.7173
		Fraksi Etil Asetat	10.40667*	.05033	.000	-10.5227	-10.2906
Konsentrasi _40	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	-.08000	.11448	.504	-.3440	.1840
		Fraksi Etil Asetat	-2.88333*	.11448	.000	-3.1473	-2.6193
		Fraksi Etanol Air	8.55000*	.11448	.000	8.2860	8.8140
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	.08000	.11448	.504	-.1840	.3440
		Fraksi Etil Asetat	-2.80333*	.11448	.000	-3.0673	-2.5393
		Fraksi Etanol Air	8.63000*	.11448	.000	8.3660	8.8940
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	2.88333*	.11448	.000	2.6193	3.1473
		Fraksi Heksana	2.80333*	.11448	.000	2.5393	3.0673
		Fraksi Etanol Air	11.43333*	.11448	.000	11.1693	11.6973
	Fraksi Etanol Air	Ekstrak Etanol	-8.55000*	.11448	.000	-8.8140	-8.2860
		Fraksi Heksana	-8.63000*	.11448	.000	-8.8940	-8.3660
		Fraksi Etil Asetat	11.43333*	.11448	.000	-11.6973	-11.1693
Konsentrasi _50	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	-.30667	.14926	.074	-.6509	.0375

	Fraksi Etil Asetat	-3.09333*	.14926	.000	-3.4375	-2.7491
	Fraksi Etanol Air	9.34333*	.14926	.000	8.9991	9.6875
Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	.30667	.14926	.074	-.0375	.6509
	Fraksi Etil Asetat	-2.78667*	.14926	.000	-3.1309	-2.4425
	Fraksi Etanol Air	9.65000*	.14926	.000	9.3058	9.9942
Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	3.09333*	.14926	.000	2.7491	3.4375
	Fraksi Heksana	2.78667*	.14926	.000	2.4425	3.1309
	Fraksi Etanol Air	12.43667*	.14926	.000	12.0925	12.7809
Fraksi Etanol Air	Ekstrak Etanol	-9.34333*	.14926	.000	-9.6875	-8.9991
	Fraksi Heksana	-9.65000*	.14926	.000	-9.9942	-9.3058
	Fraksi Etil Asetat	12.43667*	.14926	.000	-12.7809	-12.0925

Keterangan :

Jika nilai sig < 0,05 maka dapat dikatakan ada perbedaan yang bermakna

Jika nilai sig > 0,05 maka dapat dikatakan tidak ada perbedaan atau sama

Lampiran H. Hasil Analisis Data Statistik Luas Zona Hambat Ekstrak dan Fraksi Daun Kaca Piring

1. Analisis antar konsentrasi pada sampel yang sama

Tests of Normality^{b,c,d,e,f,g,h,i,j}

	Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekstrak	10%	.192	3	.	.997	3	.895
	20%	.353	3	.	.822	3	.169
	30%	.242	3	.	.973	3	.684
	40%	.326	3	.	.873	3	.305
	50%	.274	3	.	.945	3	.546
Heksana	10%	.179	3	.	.999	3	.948
	20%	.243	3	.	.973	3	.682
	30%	.250	3	.	.967	3	.650
	40%	.192	3	.	.997	3	.897
	50%	.179	3	.	.999	3	.948
Etilasetat	10%	.364	3	.	.799	3	.111
	20%	.298	3	.	.916	3	.439
	30%	.301	3	.	.912	3	.424
	40%	.182	3	.	.999	3	.937
	50%	.261	3	.	.957	3	.602

Keterangan:

b, c, d, e, f, g, h, i, j = fraksi etanol air pada konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50% **diabaikan** karena tidak menghasilkan zona hambatan

Hasil *Test of Normality Shapiro-Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ekstrak	2.354	5	12	.104

Heksana	1.768	5	12	.194
Etilasetat	1.797	5	12	.188
Etanolair	.	5	.	.

Keterangan:

Fraksi etanol air tidak ada nilai *p value* karena tidak menghasilkan zona hambat
 Hasil *Test of Homogeneity of Variance* menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ekstrak	Between Groups	12720.222	5	2544.044	3400.163	.000
	Within Groups	8.979	12	.748		
	Total	12729.201	17			
Heksana	Between Groups	10747.720	5	2149.544	1514.339	.000
	Within Groups	17.034	12	1.419		
	Total	10764.753	17			
Etilasetat	Between Groups	62353.065	5	12470.613	13672.123	.000
	Within Groups	10.945	12	.912		
	Total	62364.010	17			
Etanolair	Between Groups	.000	5	.000		
	Within Groups	.000	12	.000		
	Total	.000	17			

Keterangan:

Fraksi etanol air tidak ada nilai *p value* karena tidak menghasilkan zona hambat
 Nilai p yang diperoleh adalah $p < 0,05$ yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan pada nilai zona hambat pada setiap konsentrasi uji dari masing-masing sampel

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Ekstrak	10%	20%	-7.31667*	.70626	.000	-8.8555	-5.7779
		30%	-19.46800*	.70626	.000	-21.0068	-17.9292
		40%	-31.59300*	.70626	.000	-33.1318	-30.0542
		50%	-44.07067*	.70626	.000	-45.6095	-42.5319
		Kontrol negatif	39.17267*	.70626	.000	37.6339	40.7115
	20%	10%	7.31667*	.70626	.000	5.7779	8.8555

		30%	-12.15133 [*]	.70626	.000	-13.6901	-10.6125
		40%	-24.27633 [*]	.70626	.000	-25.8151	-22.7375
		50%	-36.75400 [*]	.70626	.000	-38.2928	-35.2152
		Kontrol negatif	46.48933 [*]	.70626	.000	44.9505	48.0281
	30%	10%	19.46800 [*]	.70626	.000	17.9292	21.0068
		20%	12.15133 [*]	.70626	.000	10.6125	13.6901
		40%	-12.12500 [*]	.70626	.000	-13.6638	-10.5862
		50%	-24.60267 [*]	.70626	.000	-26.1415	-23.0639
		Kontrol negatif	58.64067 [*]	.70626	.000	57.1019	60.1795
	40%	10%	31.59300 [*]	.70626	.000	30.0542	33.1318
		20%	24.27633 [*]	.70626	.000	22.7375	25.8151
		30%	12.12500 [*]	.70626	.000	10.5862	13.6638
		50%	-12.47767 [*]	.70626	.000	-14.0165	-10.9389
		Kontrol negatif	70.76567 [*]	.70626	.000	69.2269	72.3045
	50%	10%	44.07067 [*]	.70626	.000	42.5319	45.6095
		20%	36.75400 [*]	.70626	.000	35.2152	38.2928
		30%	24.60267 [*]	.70626	.000	23.0639	26.1415
		40%	12.47767 [*]	.70626	.000	10.9389	14.0165
		Kontrol negatif	83.24333 [*]	.70626	.000	81.7045	84.7821
	Kontrol negatif	10%	-39.17267 [*]	.70626	.000	-40.7115	-37.6339
		20%	-46.48933 [*]	.70626	.000	-48.0281	-44.9505
		30%	-58.64067 [*]	.70626	.000	-60.1795	-57.1019
		40%	-70.76567 [*]	.70626	.000	-72.3045	-69.2269
		50%	-83.24333 [*]	.70626	.000	-84.7821	-81.7045
Heksana	10%	20%	-5.30033 [*]	.97278	.000	-7.4198	-3.1808
		30%	-12.57333 [*]	.97278	.000	-14.6928	-10.4538
		40%	-17.67067 [*]	.97278	.000	-19.7902	-15.5512

	50%	-44.92500 [*]	.97278	.000	-47.0445	-42.8055
	Kontrol negatif	37.13333 [*]	.97278	.000	35.0138	39.2528
20%	10%	5.30033 [*]	.97278	.000	3.1808	7.4198
	30%	-7.27300 [*]	.97278	.000	-9.3925	-5.1535
	40%	-12.37033 [*]	.97278	.000	-14.4898	-10.2508
	50%	-39.62467 [*]	.97278	.000	-41.7442	-37.5052
	Kontrol negatif	42.43367 [*]	.97278	.000	40.3142	44.5532
30%	10%	12.57333 [*]	.97278	.000	10.4538	14.6928
	20%	7.27300 [*]	.97278	.000	5.1535	9.3925
	40%	-5.09733 [*]	.97278	.000	-7.2168	-2.9778
	50%	-32.35167 [*]	.97278	.000	-34.4712	-30.2322
	Kontrol negatif	49.70667 [*]	.97278	.000	47.5872	51.8262
40%	10%	17.67067 [*]	.97278	.000	15.5512	19.7902
	20%	12.37033 [*]	.97278	.000	10.2508	14.4898
	30%	5.09733 [*]	.97278	.000	2.9778	7.2168
	50%	-27.25433 [*]	.97278	.000	-29.3738	-25.1348
	Kontrol negatif	54.80400 [*]	.97278	.000	52.6845	56.9235
50%	10%	44.92500 [*]	.97278	.000	42.8055	47.0445
	20%	39.62467 [*]	.97278	.000	37.5052	41.7442
	30%	32.35167 [*]	.97278	.000	30.2322	34.4712
	40%	27.25433 [*]	.97278	.000	25.1348	29.3738
	Kontrol negatif	82.05833 [*]	.97278	.000	79.9388	84.1778
Kontrol negatif	10%	-37.13333 [*]	.97278	.000	-39.2528	-35.0138
	20%	-42.43367 [*]	.97278	.000	-44.5532	-40.3142
	30%	-49.70667 [*]	.97278	.000	-51.8262	-47.5872
	40%	-54.80400 [*]	.97278	.000	-56.9235	-52.6845
	50%	-82.05833 [*]	.97278	.000	-84.1778	-79.9388

Etilasetat	10%	20%	-21.72633 [*]	.77979	.000	-23.4254	-20.0273
		30%	-45.67500 [*]	.77979	.000	-47.3740	-43.9760
		40%	-71.60667 [*]	.77979	.000	-73.3057	-69.9076
		50%	-91.14200 [*]	.77979	.000	-92.8410	-89.4430
		Kontrol negatif	89.84733 [*]	.77979	.000	88.1483	91.5464
<hr/>							
20%	10%	10%	21.72633 [*]	.77979	.000	20.0273	23.4254
		30%	-23.94867 [*]	.77979	.000	-25.6477	-22.2496
		40%	-49.88033 [*]	.77979	.000	-51.5794	-48.1813
		50%	-69.41567 [*]	.77979	.000	-71.1147	-67.7166
		Kontrol negatif	111.57367 [*]	.77979	.000	109.8746	113.2727
<hr/>							
30%	10%	10%	45.67500 [*]	.77979	.000	43.9760	47.3740
		20%	23.94867 [*]	.77979	.000	22.2496	25.6477
		40%	-25.93167 [*]	.77979	.000	-27.6307	-24.2326
		50%	-45.46700 [*]	.77979	.000	-47.1660	-43.7680
		Kontrol negatif	135.52233 [*]	.77979	.000	133.8233	137.2214
<hr/>							
40%	10%	10%	71.60667 [*]	.77979	.000	69.9076	73.3057
		20%	49.88033 [*]	.77979	.000	48.1813	51.5794
		30%	25.93167 [*]	.77979	.000	24.2326	27.6307
		50%	-19.53533 [*]	.77979	.000	-21.2344	-17.8363
		Kontrol negatif	161.45400 [*]	.77979	.000	159.7550	163.1530
<hr/>							
50%	10%	10%	91.14200 [*]	.77979	.000	89.4430	92.8410
		20%	69.41567 [*]	.77979	.000	67.7166	71.1147
		30%	45.46700 [*]	.77979	.000	43.7680	47.1660
		40%	19.53533 [*]	.77979	.000	17.8363	21.2344
		Kontrol negatif	180.98933 [*]	.77979	.000	179.2903	182.6884
<hr/>							
Kontrol	10%		-89.84733 [*]	.77979	.000	-91.5464	-88.1483

negatif	20%	-111.57367 [*]	.77979	.000	-113.2727	-109.8746
	30%	-135.52233 [*]	.77979	.000	-137.2214	-133.8233
	40%	-161.45400 [*]	.77979	.000	-163.1530	-159.7550
	50%	-180.98933 [*]	.77979	.000	-182.6884	-179.2903

Keterangan :

Jika nilai sig < 0,05 maka dapat dikatakan ada perbedaan yang bermakna

Jika nilai sig > 0,05 maka dapat dikatakan tidak ada perbedaan atau sama

2. Analisis antar sampel pada konsentrasi yang sama

Tests of Normality^{a,b,c,d,f,g,h,i,j}

	Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^e			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsentrasi_10	Ekstrak Etanol	.192	3	.	.997	3	.895
	Fraksi Heksana	.179	3	.	.999	3	.948
	Fraksi Etil Asetat	.364	3	.	.799	3	.111
Konsentrasi_20	Ekstrak Etanol	.353	3	.	.822	3	.169
	Fraksi Heksana	.243	3	.	.973	3	.682
	Fraksi Etil Asetat	.369	3	.	.790	3	.090
Konsentrasi_30	Ekstrak Etanol	.242	3	.	.973	3	.684
	Fraksi Heksana	.250	3	.	.967	3	.650
	Fraksi Etil Asetat	.301	3	.	.912	3	.424
Konsentrasi_40	Ekstrak Etanol	.326	3	.	.873	3	.305
	Fraksi Heksana	.192	3	.	.997	3	.897
	Fraksi Etil Asetat	.182	3	.	.999	3	.937
Konsentrasi_50	Ekstrak Etanol	.274	3	.	.945	3	.546
	Fraksi Heksana	.179	3	.	.999	3	.948
	Fraksi Etil Asetat	.261	3	.	.957	3	.602

Keterangan:

b, c, d, e, f = fraksi etanol air pada konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50% *diabaikan* karena tidak menghasilkan zona hambat

Hasil *Test of Normality Shapiro-Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kontrol_negatif	.	3	.	.
Konsentrasi_10	3.379	3	8	.075
Konsentrasi_20	3.788	3	8	.059
Konsentrasi_30	3.726	3	8	.061
Konsentrasi_40	2.415	3	8	.142
Konsentrasi_50	3.286	3	8	.079

Hasil *Test of Homogeneity of Variance* menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kontrol_negatif	Between Groups	.000	3	.000	.	.
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	.000	11			
Konsentrasi_10	Between Groups	12230.753	3	4076.918	14447.323	.000
	Within Groups	2.258	8	.282		
	Total	12233.011	11			
Konsentrasi_20	Between Groups	19043.823	3	6347.941	29342.372	.000
	Within Groups	1.731	8	.216		
	Total	19045.554	11			
Konsentrasi_30	Between Groups	28223.039	3	9407.680	9695.276	.000
	Within Groups	7.763	8	.970		
	Total	28230.802	11			
Konsentrasi_40	Between Groups	40089.828	3	13363.276	16444.248	.000
	Within Groups	6.501	8	.813		

Total		40096.329	11			
Konsentrasi_50	Between Groups	49595.879	3	16531.960	15511.695	.000
	Within Groups	8.526	8	1.066		
	Total	49604.405	11			

Keterangan:

Nilai p yang diperoleh adalah $p < 0,05$ yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan pada nilai zona hambat pada setiap konsentrasi uji dari masing-masing sampel

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Konsentrasi_10	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	2.33933*	.43374	.001	1.3391	3.3395
		Fraksi Etil Asetat	-50.34200*	.43374	.000	-51.3422	-49.3418
		Fraksi Etanol Air	39.43933*	.43374	.000	38.4391	40.4395
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	-2.33933*	.43374	.001	-3.3395	-1.3391
		Fraksi Etil Asetat	-52.68133*	.43374	.000	-53.6815	-51.6811
		Fraksi Etanol Air	37.10000*	.43374	.000	36.0998	38.1002
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	50.34200*	.43374	.000	49.3418	51.3422
		Fraksi Heksana	52.68133*	.43374	.000	51.6811	53.6815
		Fraksi Etanol Air	89.78133*	.43374	.000	88.7811	90.7815
	Fraksi Etanol Air	Ekstrak Etanol	-39.43933*	.43374	.000	-40.4395	-38.4391
		Fraksi Heksana	-37.10000*	.43374	.000	-38.1002	-36.0998
		Fraksi Etil Asetat	-89.78133*	.43374	.000	-90.7815	-88.7811

Konsentrasi _20	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	4.75567*	.37977	.000	3.8799	5.6314
		Fraksi Etil Asetat	-64.31767*	.37977	.000	-65.1934	-63.4419
		Fraksi Etanol Air	47.18933*	.37977	.000	46.3136	48.0651
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	-4.75567*	.37977	.000	-5.6314	-3.8799
		Fraksi Etil Asetat	-69.07333*	.37977	.000	-69.9491	-68.1976
		Fraksi Etanol Air	42.43367*	.37977	.000	41.5579	43.3094
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	64.31767*	.37977	.000	63.4419	65.1934
		Fraksi Heksana	69.07333*	.37977	.000	68.1976	69.9491
		Fraksi Etanol Air	111.50700*	.37977	.000	110.6312	112.3828
Fraksi Etanol Air	Ekstrak Etanol	-47.18933*	.37977	.000	-48.0651	-46.3136	
	Fraksi Heksana	-42.43367*	.37977	.000	-43.3094	-41.5579	
	Fraksi Etil Asetat	-111.50700*	.37977	.000	-112.3828	-110.6312	
Konsentrasi _30	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	8.93400*	.80430	.000	7.0793	10.7887
		Fraksi Etil Asetat	-76.88167*	.80430	.000	-78.7364	-75.0270
		Fraksi Etanol Air	58.64067*	.80430	.000	56.7860	60.4954
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	-8.93400*	.80430	.000	-10.7887	-7.0793
		Fraksi Etil Asetat	-85.81567*	.80430	.000	-87.6704	-83.9610
		Fraksi Etanol Air	49.70667*	.80430	.000	47.8520	51.5614
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	76.88167*	.80430	.000	75.0270	78.7364
		Fraksi Heksana	85.81567*	.80430	.000	83.9610	87.6704

		Fraksi Etanol Air	135.52233*	.80430	.000	133.6676	137.3770
	Fraksi Etanol Air	Ekstrak Etanol	-58.64067*	.80430	.000	-60.4954	-56.7860
		Fraksi Heksana	-49.70667*	.80430	.000	-51.5614	-47.8520
		Fraksi Etil Asetat	-135.52233*	.80430	.000	-137.3770	-133.6676
Konsentrasi _40	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	16.29500*	.73604	.000	14.5977	17.9923
		Fraksi Etil Asetat	-89.68833*	.73604	.000	-91.3857	-87.9910
		Fraksi Etanol Air	71.09900*	.73604	.000	69.4017	72.7963
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	-16.29500*	.73604	.000	-17.9923	-14.5977
		Fraksi Etil Asetat	-105.98333*	.73604	.000	-107.6807	-104.2860
		Fraksi Etanol Air	54.80400*	.73604	.000	53.1067	56.5013
	Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	89.68833*	.73604	.000	87.9910	91.3857
		Fraksi Heksana	105.98333*	.73604	.000	104.2860	107.6807
		Fraksi Etanol Air	160.78733*	.73604	.000	159.0900	162.4847
	Fraksi Etanol Air	Ekstrak Etanol	-71.09900*	.73604	.000	-72.7963	-69.4017
		Fraksi Heksana	-54.80400*	.73604	.000	-56.5013	-53.1067
		Fraksi Etil Asetat	-160.78733*	.73604	.000	-162.4847	-159.0900
Konsentrasi _50	Ekstrak Etanol	Fraksi Heksana	.785000	.84292 1	.379	-1.15878	2.72878
		Fraksi Etil Asetat	-98.612667*	.84292 1	.000	-100.55645	-96.66889
		Fraksi Etanol Air	82.843333*	.84292 1	.000	80.89955	84.78711
	Fraksi Heksana	Ekstrak Etanol	-.785000	.84292 1	.379	-2.72878	1.15878

	Fraksi Etil Asetat	-99.397667*	.84292 1	.000	-101.34145	-97.45389
	Fraksi Etanol Air	82.058333*	.84292 1	.000	80.11455	84.00211
Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Etanol	98.612667*	.84292 1	.000	96.66889	100.55645
	Fraksi Heksana	99.397667*	.84292 1	.000	97.45389	101.34145
	Fraksi Etanol Air	181.456000*	.84292 1	.000	179.51222	183.39978
Fraksi Etanol Air	Ekstrak Etanol	-82.843333*	.84292 1	.000	-84.78711	-80.89955
	Fraksi Heksana	-82.058333*	.84292 1	.000	-84.00211	-80.11455
	Fraksi Etil Asetat	-181.456000*	.84292 1	.000	-183.39978	-179.51222

Keterangan:

Jika nilai sig < 0,05 maka dapat dikatakan ada perbedaan yang bermakna

Jika nilai sig > 0,05 maka dapat dikatakan tidak ada perbedaan atau sama

Lampiran I. Perbandingan Luas Zona Hambat Pengukuran dengan Jangka Sorong dan *Software ImageJ*

Sampel	Konsentrasi	Luas zona hambat (mm ²)	
		Jangka sorong	Software ImageJ
Ekstrak etanol	10%	32,70±0,95 ^(a)	34,44±0,41 ^(a)
	20%	40,20±1,38 ^(b)	47,19±0,35 ^(b)
	30%	46,14±0,73 ^(c)	58,64±0,58 ^(c)
	40%	57,44±1,68 ^(d)	71,10±1,10 ^(d)
	50%	68,52±1,94 ^(e)	82,84±0,67 ^(e)
Fraksi heksana	10%	34,52±0,38 ^(f)	37,10±0,57 ^(f)
	20%	40,71±1,38 ^(g)	42,43±0,76 ^(h)
	30%	48,17±0,95 ⁽ⁱ⁾	49,71±1,52 ⁽ⁱ⁾
	40%	58,50±2,71 ^(k)	54,06±1,20 ^(l)
	50%	73,11±3,25 ^(m)	82,06±1,34 ^(m)
Fraksi etil asetat	10%	56,59±2,85 ⁽ⁿ⁾	89,78±0,79 ⁽ⁿ⁾
	20%	70,97±3,41 ^(o)	111,57±0,35 ^(o)
	30%	84,98±1,23 ^(p)	135,52±1,09 ^(p)
	40%	102,59±2,82 ^(q)	160,79±0,76 ^(q)
	50%	121,47±5,18 ^(r)	181,46±1,01 ^(r)

Keterangan:

Data ditampilkan dalam rata-rata ± SD

Data dengan huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna (>0,05) pada metode yang berbeda dengan sampel dan konsentrasi yang sama

Lampiran J. Hasil Uji *T-Test* Diameter dan Luas Zona Hambat Aktivitas Antibakteri

1. Ekstrak etanol

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Konsentrasi 10%	Equal variances assumed	1.636	.270	-11.224	4	.000	-6.74667	.60110	-8.41559	-5.07774
	Equal variances not assumed			-11.224	2.752	.002	-6.74667	.60110	-8.76111	-4.73222

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Konsentrasi 20%	Equal variances assumed	2.128	.218	-8.477	4	.001	-6.99000	.82458	-9.27940	-4.70060
	Equal variances not assumed			-8.477	2.251	.009	-6.99000	.82458	-10.18445	-3.79555

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Konsentrasi 30%	Equal variances assumed	.207	.673	-23.115	4	.000	-12.50000	.54077	-14.00142	-10.99858
	Equal variances not assumed			-23.115	3.806	.000	-12.50000	.54077	-14.03204	-10.96796

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Konsentrasi 40%	Equal variances assumed	.856	.407	-11.745	4	.000	-13.66000	1.16307	-16.88920	-10.43080
	Equal variances not assumed			-11.745	3.455	.001	-13.66000	1.16307	-17.10042	-10.21958

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Konsentrasi 50%	Equal variances assumed	4.984	.089	-12.011	4	.000	-14.32000	1.19225	-17.63021	-11.00979
	Equal variances not assumed			-12.011	2.479	.003	-14.32000	1.19225	-18.60827	-10.03173

2. Fraksi heksana

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Konsentrasi 10%	Equal variances assumed	.337	.593	-6.496	4	.003	-2.58000	.39719	-3.68277	-1.47723
	Equal variances not assumed			-6.496	3.475	.005	-2.58000	.39719	-3.75162	-1.40838

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Konsentrasi 20%	Equal variances assumed	.712	.446	-1.890	4	.132	-1.71700	.90862	-4.23975	.80575
	Equal variances not assumed			-1.890	3.117	.152	-1.71700	.90862	-4.54831	1.11431

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Konsentrasi 30%	Equal variances assumed	.827	.415	-1.476	4	.214	-1.53333	1.03864	-4.41707	1.35041
	Equal variances not assumed			-1.476	3.339	.227	-1.53333	1.03864	-4.65676	1.59010

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Konsentrasi 40%	Equal variances assumed	2.573	.184	2.164	4	.096	3.69933	1.70955	-1.04713	8.44580
	Equal variances not assumed			2.164	2.759	.127	3.69933	1.70955	-2.02072	9.41939

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Konsentrasi 50%	Equal variances assumed	.769	.430	-4.096	4	.015	-8.94833	2.18471	-15.01406	-2.88261
	Equal variances not assumed			-4.096	3.266	.022	-8.94833	2.18471	-15.59107	-2.30560

3. Fraksi etil asetat

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Konsentrasi 10%	Equal variances assumed	2.320	.202	-19.460	4	.000	-33.18467	1.70527	-37.91925	-28.45008
	Equal variances not assumed			-19.460	2.306	.001	-33.18467	1.70527	-39.66258	-26.70675

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Konsentrasi 20%	Equal variances assumed	11.043	.029	-20.501	4	.000	-40.60033	1.98043	-46.09889	-35.10178
	Equal variances not assumed			-20.501	2.043	.002	-40.60033	1.98043	-48.95052	-32.25015

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Konsentrasi 30%	Equal variances assumed	.035	.861	-53.218	4	.000	-50.53900	.94966	-53.17567	-47.90233
	Equal variances not assumed			-53.218	3.950	.000	-50.53900	.94966	-53.18881	-47.89919

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Konsentrasi 40%	Equal variances assumed	2.651	.179	-34.501	4	.000	-58.19400	1.68674	-62.87715	-53.51085
	Equal variances not assumed			-34.501	2.293	.000	-58.19400	1.68674	-64.63090	-51.75710

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Konsentrasi 50%	Equal variances assumed	13.027	.023	-20.037	4	.000	-59.98267	2.99358	-68.29418	-51.67115
	Equal variances not assumed			-20.037	2.005	.002	-59.98267	2.99358	-72.83046	-47.13488

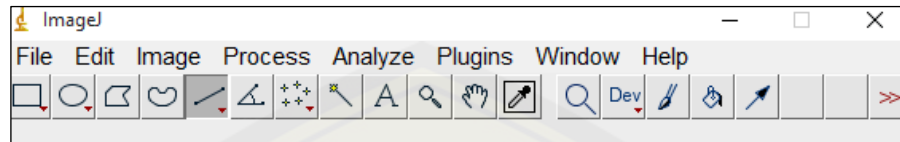
Keterangan :

jika nilai sig (*2-tailed*) < 0,05 maka dapat dikatakan ada perbedaan yang bermakna antara pengukuran menggunakan diameter dan luas zona hambat

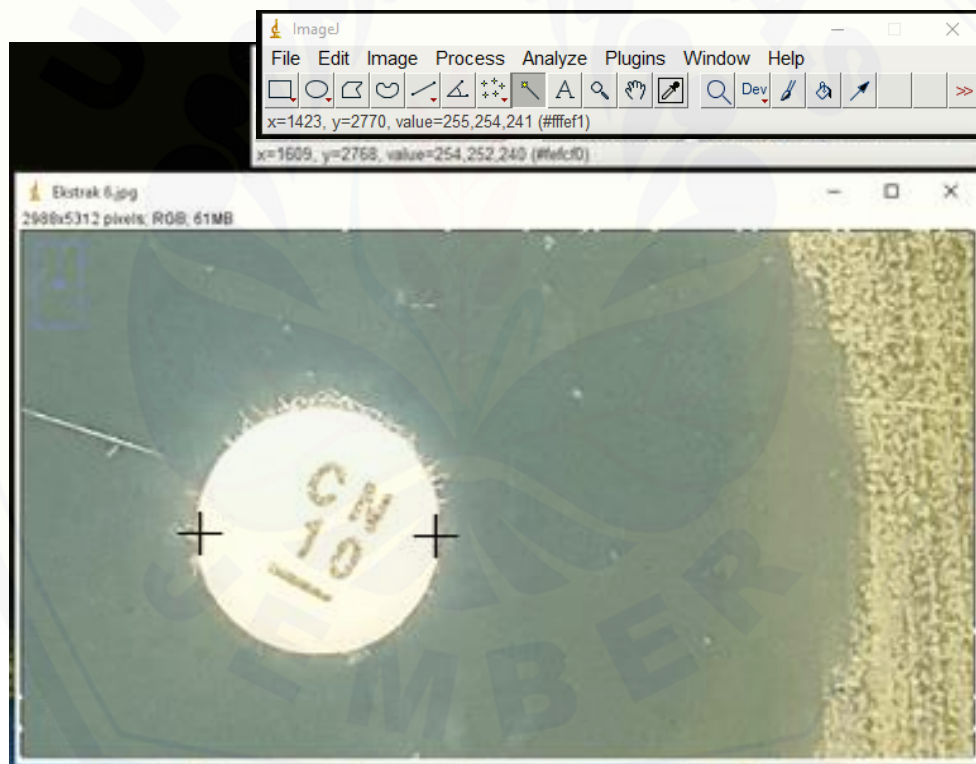
jika nilai sig (*2-tailed*) > 0,05 maka dapat dikatakan tidak ada perbedaan atau sama antara pengukuran menggunakan diameter dan luas zona hambat

Lampiran K. Cara Analisis Data Luas dengan *Software ImageJ*

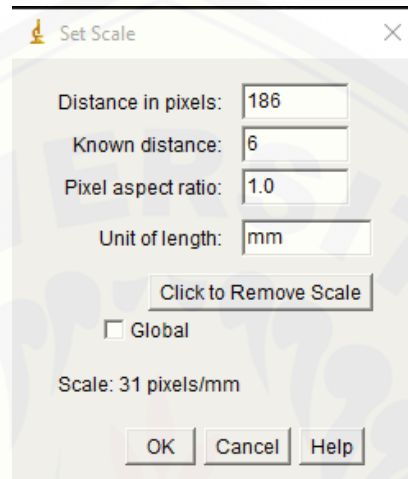
1. Membuka *Software ImageJ*.



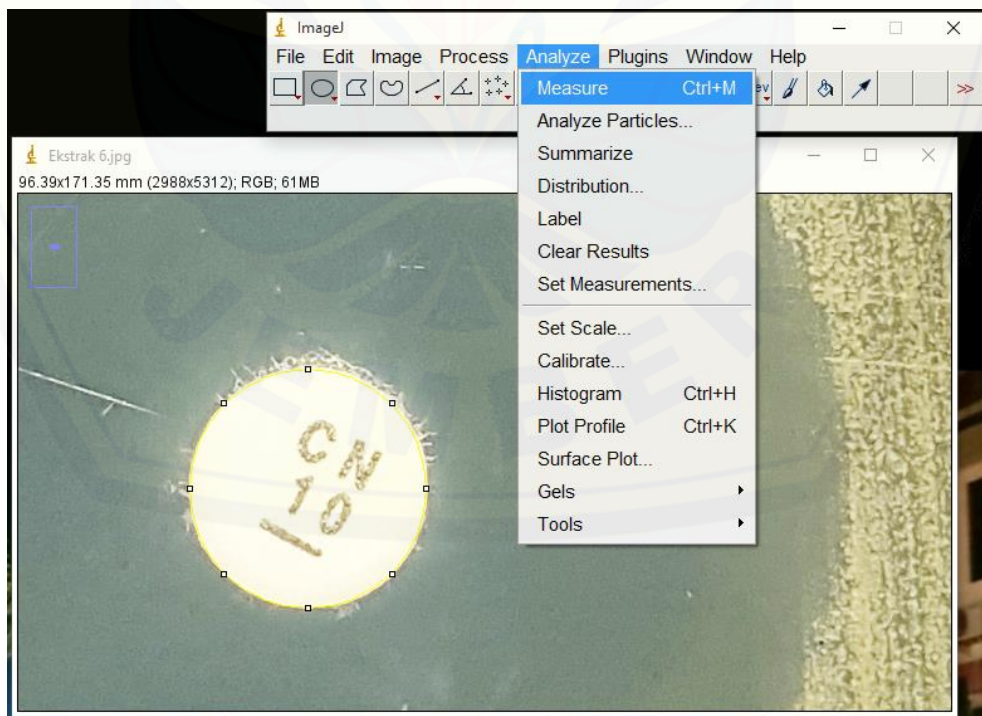
2. Gambar yang akan dianalisis, dibuka melalui menu klik *File, Open*. Pilih gambar yang akan dibuka. Tempatkan kursor pada ujung paling kiri cakram yang digunakan sebagai patokan dan lihat nilai x (contoh 1609), geser kursor ke ujung paling kanan lubang perforator dan amati nilai x (contoh 1423).



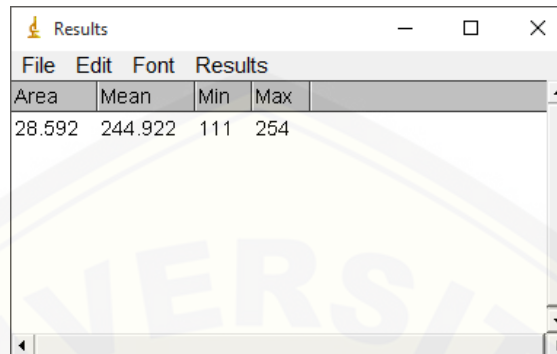
3. Buka menu *Analyze, Set Scale*. Pada kolom *Distance in pixels* masukkan nilai lebar perforator dalam pixel dari pengamatan sebelumnya ($1609-1423=186$ pixels). Pada kolom *Known distance* masukkan diameter cakram sebenarnya (diameter 6 mm). Pada kolom *Unit of length*, masukkan mm. Kemudian klik OK.



4. Gunakan lasso tool berbentuk lingkaran untuk melingkari cakram. Kemudian klik menu *Analyze, Measure* atau tekan shortcut Ctrl-M.



5. Akan muncul jendela baru yang menunjukkan luas cakram. Berdasarkan perhitungan manual, lingkaran dengan diameter 6 mm adalah $28,26 \text{ mm}^2$. Hasil yang ditunjukkan harus tidak jauh berbeda dengan nilai tersebut.



Area	Mean	Min	Max
28.592	244.922	111	254

6. Lakukan hal yang sama pada lingkaran zona hambat, sebagai contoh hasil luas zona hambat yang dihasilkan oleh gentamisin cakram, sebesar $582,134 \text{ mm}^2$.

