

**AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK ETANOL 80% DAN FRAKSI BUAH
JAMBU WER (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) PADA BAKTERI *Bacillus subtilis***

ATCC 19659

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh:

Afifah Nuraini

NIM 155070501111004

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

**HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR**

**AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK ETANOL 80% DAN FRAKSI BUAH JAMBU WER
(*Prunus persica Sieb. & Zucc*) PADA BAKTERI *Bacillus subtilis* ATCC 19659**

Oleh :

Afifah Nuraini

155070501111004

Telah diuji pada

Hari : Senin

Tanggal : 1 Juli 2019

Dan dinyatakan lulus oleh

Penguji I

Dr.Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt

NIP. 195408231981032001

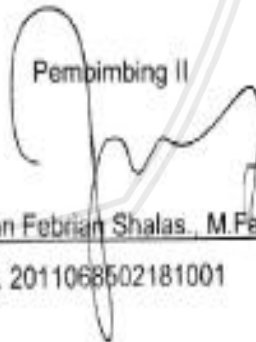
Pembimbing I



Uswatun Khasanah, M.Farm., Apt

NIP. 2011068512222001

Pembimbing II



Alvan Febrin Shalas, M.Farm., Apt

NIP. 2011068502181001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Farmasi

Alvan Febrin Shalas, M.Farm., Apt

NIP. 2011068502181001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Afifah Nuraini

NIM : 155070501111004

Program Studi : Program Studi Sarjana Farmasi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 08 April 2019

Yang membuat pernyataan,



(Afifah Nuraini)

NIM. 155070501111004

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah Yang Maha Esa atas berkah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul **“AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK ETANOL 80% DAN FRAKSI BUAH JAMBU WER (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) PADA BAKTERI *Bacillus subtilis ATCC 19659*”**.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada seluruh pihak yang telah membantu penyelesaiannya, antara lain:

1. Alvan Febrian Shalas, S.Farm., M.Farm., Apt, selaku Ketua Program Studi Farmasi.
2. Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt, selaku dosen pembimbing I dan pemilik proyek penelitian ini yang dengan sabar telah memberikan arahan, bimbingan, dan saran yang membangun dalam menyelesaikan Tugas Akhir.
3. Alvan Febrian Shalas., S.Farm., M.Farm., Apt, selaku dosen pembimbing II dan pemilik proyek penelitian ini yang sabar telah memberikan arahan, bimbingan, dan saran yang membangun dalam menyelesaikan Tugas Akhir.
4. Dr.Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt, selaku penguji yang telah meberikan banyak masukan pada penulis.
5. Hananditia Rachma P, S.Farm., M.Farm.Klin., Apt., selaku ketua tim Tugas Akhir Program Studi Sarjana Farmasi.
6. Ratna Kurnia Ilahi, S.Farm., M.Farm.,Apt, selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing saya selama menempuh pendidikan di Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
7. Segenap admin dan PLP yang telah membantu melancarkan urusan administrasi sehingga saya dapat melaksanakan Tugas Akhir dengan lancar.
8. Kedua orang tua saya tercinta, Bapak Sudiono dan Ibu Nanik Jumrodah, serta saudara saya Ika dan Meita yang senantiasa memberikan doa,

dukungan, semangat, dan kasih sayang sehingga saya bisa menyelesaikan Tugas Akhir ini.

9. Teman seperjuangan penelitian *Prunus persica Sieb & Zucc*, Kak Syifa, Kak Nia, Kak Ayu, Kak Aisyah yang telah berjuang bersama menyelesaikan amanah penelitian ini.
10. Teman seperjuangan penelitian, Regi, yang selalu memberikan arahan dan semangat selama penelitian hingga penulisan Tugas Akhir ini selesai.
11. Sahabat tercinta saya "Porenjes" Devi, Cinta, Firda, Nadia, Ida, Nina yang selalu ada dan menjadi pendengar, penasihat, pendukung, penyemangat untuk saya. Serta Nindy, Asti, Lian, Candra, Nela yang selalu memberikan motivasi dan arahan untuk saya.
12. Sahabat tercinta saya Nisa Rizqa, Dewi yang menjadi pendengar yang baik, penasihat, pendukung, penyemangat serta membantu dalam penyelesaian penulisan Proposal Tugas Akhir hingga penulisan Tugas Akhir selesai.
13. Partner terbaik saya yaitu Ade, Nisa hanifatin, Kiki, Febi, Omi serta teman-teman Farmasi 2015 yang berjuang bersama saya.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan Tugas Akhir ini masih terdapat kekurangan dan membutuhkan kritik maupun saran untuk perbaikan. Semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat.

Malang, 8 Juli 2019

Penulis

ABSTRAK

Nuraini, Afifah. 2019. **AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK ETANOL 80% DAN FRAKSI BUAH JAMBU WER (*Prunus persica* Sieb.&Zucc) PADA BAKTERI *Bacillus subtilis* ATCC 19659**. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Pembimbing : (1) Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt (2) Alvan Febrian Shalas., S.Farm., M.Farm., Apt.

Penggunaan antibiotik dengan intensitas tinggi dapat menimbulkan masalah kesehatan di dunia seperti terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik. Keanekaragaman hayati Indonesia menjadi potensi bagi pengembangan obat dari tanaman sebagai antimikroba. Salah satunya adalah buah jambu wer (*Prunus persica* Sieb. & Zucc.) yang banyak digunakan masyarakat Suku Tengger untuk mengobati penyakit diare. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antimikroba dari ekstrak etanol 80%, fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol, dan air buah jambu wer (*Prunus persica* Sieb.&Zucc.) terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi sehingga diperoleh ekstrak 80%. Kemudian dilanjutkan fraksinasi bertingkat sesuai dengan tingkat kepolaran sehingga diperoleh fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol, dan air. Pengujian aktivitas antimikroba *Bacillus subtilis* ATCC 19659 dilakukan dengan metode mikrodilusi. Kosentrasi larutan uji yang digunakan 50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1562,5, 781,25, 390.63, 195.31, dan 97.66 ppm. Hasil KHM yang diperoleh dari masing-masing sampel adalah ekstrak etanol 80% sebesar 12500 ppm, fraksi kloroform sebesar 25000 ppm, fraksi etil asetat sebesar 12500 ppm, fraksi n-butanol sebesar 25000 ppm, dan fraksi air sebesar 50000 ppm. Nilai KBM yang diperoleh ekstrak etanol 80% sebesar 25000 ppm, fraksi kloroform, dan etil asetat memiliki nilai KBM yang sama yaitu sebesar 50000 ppm. Fraksi n-butanol dan air membutuhkan konsentrasi lebih dari 50000 ppm untuk dapat membunuh bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Berdasarkan hasil penapisan fitokimia fraksi buah jambu wer (*Prunus persica* Sieb. & Zucc.) mengandung terpenoid, flavonoid, dan polifenol.

Kata kunci: Buah jambu wer (*Prunus persica* Sieb. & Zucc.), Antimikroba, Mikrodilusi, KHM, KBM.

ABSTRACT

Nuraini, Afifah. 2019. **ANTIMICROBIAL ACTIVITY of EXTRACT ETHANOL 80% and FRACTION JAMBU WER FRUIT (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) AGAINST *Bacillus subtilis* ATCC 19659**. Final Assigment, Pharmacy Program, Medical Faculty Brawijaya University, Supervisors : (1) Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt (2) Alvan Febrian Shalas., S.Farm., M.Farm., Apt.

The use of high intensity antibiotics can cause health problems in the world such as bacterial resistance to antibiotics. Indonesia biodiversity is a potential for the development of medicinal plants as antimicrobials. One of them is jambu wer fruit (*Prunus persica Sieb. & Zucc.*), which is commonly used by the Tengger people to treat diarrheal diseases. The purpose of this research is to identify the antimicrobial activity from ethanol extract 80%, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, and water fraction of jambu wer fruit (*Prunus persica Sieb. & Zucc.*) againsts *Bacillus subtilis* ATCC 19659. The extraction was done by maceration method with ethanol 80%. Liquid-liquid fractination was succesfully separated using chloroform, ethyl acetate, n-butanol, and water fractions. A antimicrobial activity againsts *Bacillus subtilis* ATCC 19659 was done by microdilution method. Extract and fractions were diluted into 10 serial concentration 50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1562.5, 781.25, 390.63, 195.31, and 97.66 ppm. Resulting MIC had been got from each sample are extract etanol 80% as much as 12500 ppm, chloroform fraction as much as 12500 ppm, n-butanol fraction as much as 25000 ppm, and water fraction as much as 50000 ppm. MBC concentration value obtained ethanol extract 80% as much as 25000 ppm, chloroform, and etil asetat fraction had got MBC concentration value as equivalent as 50000 ppm. N-butanol and water fraction requires a concentration more than 50000 ppm againsts *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Based on phytochemical screening resulted from jambu wer fruits containing terpenoid, flavonoid, and polyphenol.

Keywords: Jambu wer fruit (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*), Antimicrobial, Microdilution, MIC, MBC.

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Lembar Persetujuan	ii
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	xiii
Daftar Tabel.....	xiv
Daftar Lampiran	xv
Daftar Singkatan	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.4.1 Manfaat Akademik.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis.....	7
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Antibiotik dan Resistensi Antibiotik.....	9
2.1.1 Definisi Antibiotik.....	9
2.1.2 Mekanisme Kerja Antibiotik.....	9



2.1.3 Resistensi Antibiotik.....	12
2.2 Jambu Wer.....	14
2.2.1 Klasifikasi.....	14
2.2.2 Morfologi.....	14
2.2.3 Kandungan Metabolit Sekunder.....	15
2.2.4 Aktivitas Farmakologi.....	16
2.3 Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	17
2.3.1 Manifestasi Klinis.....	19
2.4 Ekstraksi.....	21
2.4.1 Jenis Ekstraksi.....	21
2.4.1.1 Ekstraksi Dingin.....	21
2.4.2.1.1 Maserasi.....	22
2.4.2.1.2 Perkolasi.....	22
2.4.2.1.3 Sonikasi.....	23
2.4.2.2 Ekstraksi Panas.....	23
2.4.2.2.1 Infusa.....	23
2.4.2.2.2 Dekokta.....	23
2.5 Fraksinasi.....	24
2.5.1 Fraksinasi Cair-cair.....	24
2.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	24
2.7 Uji Aktivitas Bakteri.....	25
2.7.1 Metode Dilusi.....	25
2.7.1.1 <i>Borth</i>	25
2.7.1.1.1 Mikrodilusi.....	26
2.7.2.2 Agar.....	26



2.7.2 Metode Diffusi disk.....	26
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	27
3.1 Kerangka Konsep.....	28
3.2 Hipotesis Penelitian.....	29
BAB 4. METODE PENELITIAN.....	30
4.1 Rancangan Penelitian	30
4.2 Sampel Penelitian	30
4.3 Variabel Penelitian	30
4.3.1 Variabel Bebas.....	30
4.3.2 Variabel Terikat.....	31
4.3.3 Variabel Kontrol.....	31
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	31
4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian.....	32
4.5.1 Alat Penelitian	32
4.5.2 Bahan Penelitian	32
4.6 Definisi Operasional	32
4.7 Alur Penelitian	34
4.8 Prosedur Penelitian.....	34
4.8.1 Maserasi buah jambu wer (<i>Prunus persica Sieb & Zucc</i>)	34
4.8.2 Fraksinasi (Kloroform, etil-asetat, n-butanol) buah jambu wer (<i>Prunus persica Sieb & Zucc</i>)	36
4.8.3 Optimasi dan Identifikasi Profil Metabolit dengan KLT	37
4.8.3.1 Optimasi Pelarut	37
4.8.3.2 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder.....	38
4.8.3.2.1 Antrakuinon	38

4.8.3.2.2	Flavonoid.....	39
4.8.3.2.2.1	Penampak noda H ₂ SO ₄	39
4.8.3.2.2.2	Penampak noda uap amonia.....	39
4.8.3.2.3	Terpenoid	40
4.8.3.2.4	Tanin dan polifenol.....	40
4.8.3.2.4.1	Pereaksi Warna.....	40
4.8.3.2.4.1.1	Gelatin 10%	40
4.8.3.2.4.1.2	FeCl ₃	40
4.8.3.2.4.2	Uji KLT	41
4.8.3.2.5	Alkaloid	41
4.8.4	Uji Antibakteri dengan mengukur Kadar Hambat Minimum dan Kadar Bunuh Minimum (Metode Mikrodilusi).....	42
4.8.5.1	Preparasi Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	42
4.8.5.2	Mikrodilusi.....	42
4.9	Analisis Data	43
BAB V.	HASIL DAN PEMBAHASAN	45
5.1	Ekstraksi Buah Jambu Wer (<i>Prumus Persia Sieb.&Zucc.</i>).....	45
5.2	Fraksinasi Ekstrak Etanol 80% Buah Jambu Wer (<i>Prumus Persia Sieb.&Zucc.</i>).....	45
5.3	Penapisan Fitokimia	45
5.3.1	Antrakuinon.....	46
5.3.2	Flavonoid	47
5.3.2.1	Penampak Noda H ₂ SO ₄	47
5.3.2.2	Penampak Noda Amonia	48
5.3.3	Terpenoid.....	50

5.3.4 Tanin dan Polifenol	51
5.3.4.1 Perekasi Warna	51
5.3.4.1.1 Gelatin 10%	51
5.3.4.1.2 FeCl ₃	52
5.3.4.2 Uji KLT	53
5.3.5 Alkaloid.....	54
5.4 Uji Antimikroba	55
BAB VI. PEMBAHASAN	59
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	68
7.1 Kesimpulan	68
7.2 Saran	68
Daftar Pustaka	70
Lampiran	77



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Mekanisme Kerja Antibiotik pada bakteri.....	11
Gambar 2.2 Buah dan bunga jambu wer <i>Prunus persica</i> Sieb&Zucc.....	15
Gambar 2.3 Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> menggunakan mikroskop elektron.....	17
Gambar 2.4 Spora <i>Bacillus subtilis</i>	18
Gambar 2.5 Pendekatan umum diare akut infeksi.....	20
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	27
Gambar 5.1 Profil KLT Identifikasi Antrakuinon.....	47
Gambar 5.2 Profil KLT Identifikasi Flavonoid	48
Gambar 5.3 Profil KLT Identifikasi Flavonoid	50
Gambar 5.4 Profil KLT Identifikasi Terpenoid.....	51
Gambar 5.5 Identifikasi Tanin	52
Gambar 5.6 Identifikasi Tanin	52
Gambar 5.7 Profil KLT Identifikasi Polifenol	53
Gambar 5.8 Profil KLT Identifikasi Alkaloid	54
Gambar 5.9 Gambaran Mikroskopik Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	56
Gambar 5.10 Koloni Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> pada Medium <i>Nutrient Agar</i> (NA)	56
Gambar 5.11 Tes Katalase	57

DAFTAR TABEL

					Halaman
Tabel	2.1	Mekanisme	Kerja		Antibiotik
	.12				
Tabel	2.2	Karakteristik	Morfologi dan	biokimia	<i>Bacillus subtilis</i>
	.18				
Tabel	2.3	Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi senyawa			
		metabolit	sekunder.....		
	21				
Tabel	4.1	Percobaan Fase Gerak untuk Identifikasi Senyawa			
		Metabolit	Sekunder.....		
	38				
Tabel	5.1	Persentase	Rendemen		Ekstrak
	.45				
Tabel	5.2	Persentase	Rendemen		Fraksi
	.45				
Tabel	5.3	Tabel	Hasil Identifikasi	Senyawa	Metabolit Sekunder
	.55				
Tabel	5.4.	Hasil Uji Mikrodilusi Terhadap Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>			
	57				
Tabel	5.5	Hasil Uji Mikrodilusi Terhadap Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>			
		ATCC 19659			
	58				



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Perhitungan Proses Ekstraksi.....	77
Lampiran 2. Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol 80% Buah Jambu Wer (<i>Prunus persica Sieb & Zucc.</i>).....	77
Lampiran 3. Perhitungan Rendemen Fraksi Buah Jambu Wer (<i>Prunus persica Sieb & Zucc.</i>).....	77
Lampiran 4. Optimasi Pelarut Fase Gerak.....	78
Lampiran 5. Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	81
L.5.1 Sampel <i>Bacillus subtilis</i>	81
L.5.2 <i>Certificate of Analysis</i> (COA)	82

Lampiran 6. Perhitungan Pengenceran Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	83
Lampiran 7. Perhitungan Konsentrasi Sampel Mikrodilusi.....	83
Lampiran 8. Peta Mikrodilusi pada Mikroplate.....	85
Lampiran 9. Perhitungan Persen Hambatan Bakteri.....	89
L 9.1 Sampel Uji Kontrol Positif Seftriakson	89
L 9.2 Sampel Uji Ekstrak Etanol 80%	90
L 9.3 Sampel Uji Fraksi Kloroform	91
L 9.4 Sampel Uji Fraksi Etil asetat	92
L 9.5 Sampel Uji Fraksi N-butanol	93
L 9.6 Sampel Uji Fraksi Air	94
Lampiran 10. Perhitungan	94
Lampiran 11. Grafik Persen Hambatan	95
L 11.1 Sampel Uji Kontrol positif Seftriakson	95
L 11.2 Sampel Uji Ekstrak Etanol 80%	95
L 11.3 Sampel Uji Fraksi Kloroform	96
L 11.4 Sampel Uji Fraksi Etil asetat	96
L 11.5 Sampel Uji Fraksi N-butanol	97
L 11.6 Sampel Uji Fraksi Air	97
Lampiran 12. Gambar Plate Agar.....	98
L 12.1 Gambar Nutrient Plate Agar 1	98
L 12.2 Gambar Nutrient Plate Agar 2.....	99
L 12.3 Gambar Nutrient Plate Agar 3.....	100
L 12.4 Gambar Nutrient Plate Agar 4.....	101





- WHO : *World Health Organization*
- PABA : *Para Amino Benzoat*
- DNA : *Deoxyribo Nucleic Acid*
- RNA : *Ribonucleic Acid*
- MIC : *Minimum Inhibitor Concentration*
- MBC : *Minimum Bactersidal Concentration*
- KHM : *Kadar Hambat Minimum*
- KBM : *Kadar Bunuh Minimum*
- PG : *Peptidoglikan*

KLT : Kromatografi Lapis Tipis
ELISA : *Enzym Linked Immuno Assay*
OD : *Optical density*
NA : *Nutrient Agar*





HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR

AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK ETANOL 80% DAN FRAKSI BUAH JAMBU WER
(*Prunus persica Sieb.&Zucc*) PADA BAKTERI *Bacillus subtilis* ATCC 19659

Oleh :

Afifah Nuraini

155070501111004

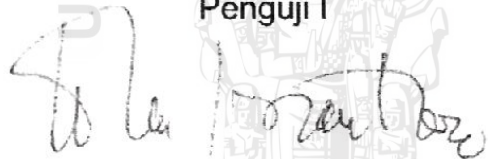
Telah diuji pada

Hari : Senin

Tanggal : 1 Juli 2019

Dan dinyatakan lulus oleh

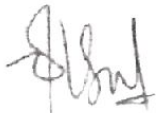
Penguji I



Dr.Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt

NIP. 195408231981032001

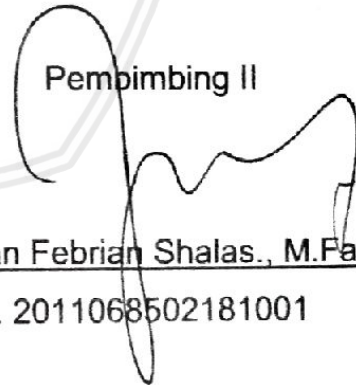
Pembimbing I



Uswatun Khasanah, M.Farm., Apt

NIP. 2011068512222001

Pembimbing II



Alvan Febrian Shalas., M.Farm., Apt

NIP. 2011068502181001

Mengetahui,

Ketua/Program Studi Sarjana Farmasi



Alvan Febrian Shalas., M.Farm., Apt

NIP. 2011068502181001

ABSTRAK

Nuraini, Afifah. 2019. **AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK ETANOL 80% DAN FRAKSI BUAH JAMBU WER (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) PADA BAKTERI *Bacillus subtilis* ATCC 19659**. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Pembimbing : (1) Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt (2) Alvan Febrian Shalas., S.Farm., M.Farm., Apt.

Penggunaan antibiotik dengan intensitas tinggi dapat menimbulkan masalah kesehatan di dunia seperti terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik. Keanekaragaman hayati Indonesia menjadi potensi bagi pengembangan obat dari tanaman sebagai antimikroba. Salah satunya adalah buah jambu wer (*Prunus persica Sieb. & Zucc.*) yang banyak digunakan masyarakat Suku Tengger untuk mengobati penyakit diare. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antimikroba dari ekstrak etanol 80%, fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol, dan air buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi sehingga diperoleh ekstrak 80%. Kemudian dilanjutkan fraksinasi bertingkat sesuai dengan tingkat kepolaran sehingga diperoleh fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol, dan air. Pengujian aktivitas antimikroba *Bacillus subtilis* ATCC 19659 dilakukan dengan metode mikrodilusi. Konsentrasi larutan uji yang digunakan 50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1562,5, 781,25, 390.63, 195.31, dan 97.66 ppm. Hasil KHM yang diperoleh dari masing-masing sampel adalah ekstrak etanol 80% sebesar 12500 ppm, fraksi kloroform sebesar 25000 ppm, fraksi etil asetat sebesar 12500 ppm, fraksi n-butanol sebesar 25000 ppm, dan fraksi air sebesar 50000 ppm. Nilai KBM yang diperoleh ekstrak etanol 80% sebesar 25000 ppm, fraksi kloroform, dan etil asetat memiliki nilai KBM yang sama yaitu sebesar 50000 ppm. Fraksi n-butanol dan air membutuhkan konsentrasi lebih dari 50000 ppm untuk dapat membunuh bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Berdasarkan hasil penapisan fitokimia fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Sieb. & Zucc.*) mengandung terpenoid, flavonoid, dan polifenol.

Kata kunci: Buah jambu wer (*Prunus persica Sieb. & Zucc.*), Antimikroba, Mikrodilusi, KHM, KBM.

ABSTRACT

Nuraini, Afifah. 2019. **ANTIMICROBIAL ACTIVITY of EXTRACT ETHANOL 80% and FRACTION JAMBU WER FRUIT (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) AGAINST *Bacillus subtilis* ATCC 19659**. Final Assigment, Pharmacy Program, Medical Faculty Brawijaya University, Supervisors : (1) Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt (2) Alvan Febrian Shalas., S.Farm., M.Farm., Apt.

The use of high intensity antibiotics can cause health problems in the world such as bacterial resistance to antibiotics. Indonesia biodiversity is a potential for the development of medicinal plants as antimicrobials. One of them is jambu wer fruit (*Prunus persica Sieb. & Zucc.*), which is commonly used by the Tengger people to treat diarrheal diseases. The purpose of this research is to identify the antimicrobial activity from ethanol extract 80%, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, and water fraction of jambu wer fruit (*Prunus persica Sieb. & Zucc.*) againsts *Bacillus subtilis* ATCC 19659. The extraction was done by maceration method with ethanol 80%. Liquid-liquid fractionation was successfully separated using chloroform, ethyl acetate, n-butanol, and water fractions. A antimicrobial activity againsts *Bacillus subtilis* ATCC 19659 was done by microdilution method. Extract and fractions were diluted into 10 serial concentration 50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1562.5, 781.25, 390.63, 195.31, and 97.66 ppm. Resulting MIC had been got from each sample are extract ethanol 80% as much as 12500 ppm, chloroform fraction as much as 12500 ppm, n-butanol fraction as much as 25000 ppm, and water fraction as much as 50000 ppm. MBC concentration value obtained ethanol extract 80% as much as 25000 ppm, chloroform, and ethyl acetate fraction had got MBC concentration value as equivalent as 50000 ppm. N-butanol and water fraction requires a concentration more than 50000 ppm againsts *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Based on phytochemical screening resulted from jambu wer fruits containing terpenoid, flavonoid, and polyphenol.

Keywords: Jambu wer fruit (*Prunus persica Sieb. &Zucc.*), Antimicrobial, Microdilution, MIC, MBC.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi menjadi penyebab utama tingginya angka kesakitan (*morbidity*) dan kematian (*mortality*) di negara-negara berkembang seperti Indonesia. Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan karena adanya bakteri patogen (Darmadi, 2008). Bakteri yang dapat menyebabkan terjadinya infeksi adalah *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Thypi*, dan lain-lain. Penyakit infeksi dapat diobati dengan penggunaan antibiotik, seperti tetrasiklin, penicillin, gentamycin, dan lain-lain.

Diare merupakan salah satu penyakit infeksi yang menjadi masalah kesehatan di dunia. *World Health Organization* (WHO) menyebutkan terjadi 1.7 juta kejadian diare di seluruh dunia (WHO, 2013). Di Indonesia dari 2.812 pasien diare disebabkan bakteri yang datang ke rumah sakit dari beberapa provinsi seperti Jakarta, Padang, Medan, Denpasar, Pontianak, Makasar dan Batam yang dianalisa dari 1995 sampai 2001, penyebab terbanyak adalah *Vibrio cholerae 01*, diikuti dengan *Shigella spp*, *Salmonella spp*, *V. Parahaemoliticus*, *Salmonella typhi*, *Campylobacter Jejuni*, *V. Cholera non-01*, dan *Salmonella paratyphi A* (Jones, ACC dan Farthing, MJG, 2004). Selain itu, diare juga dapat dikarenakan *foodborne infections* dan *waterborne infections* yang disebabkan bakteri *Salmonella spp*, *Campylobacter jejuni*, *Stafilococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* dan *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) (Zein, Umar, dkk., 2004; Logan, N.A., 2011). Banyak dilaporkan

keracunan makanan yang disebabkan oleh bakteri *Bacillus subtilis*. Di Nagano, Jepang pada tahun 1978 dilaporkan terjadi keracunan makanan yang disebabkan oleh bakteri *Bacillus subtilis* di sebuah sekolah menengah. Terdapat 586 anak-anak dan staf anggota mengalami gejala sakit perut, mual, muntah, dan diare setelah makan 'Yasai-karashi-ae' (sayuran yang diberi mustard) yang disiapkan di dapur sekolah tersebut. Selain itu, terdapat laporan mengenai keracunan bakteri *Bacillus subtilis* setelah makan daging yang sudah dimasak dan disimpan selama satu malam di suhu ruang (Ueda, dan Yoshihiro, 1999).

Bacillus subtilis merupakan bakteri Gram positif yang dapat membentuk endospora berbentuk oval di bagian sentra. Manifestasi klinis dari *Bacillus subtilis* antara lain diare, meningitis, endokarditis, dan infeksi mata. Toksin yang dihasilkan bakteri *Bacillus subtilis* pada usus dapat menimbulkan respon inflamasi seperti nyeri abdominal, mual, muntah dan diare (Aini, dkk., 2013 ; Baron, Samuel, 1996). Bakteri ini umumnya masuk ke dalam tubuh melalui kontaminasi makanan secara oral. Terapi infeksi akibat bakteri *Bacillus subtilis* adalah eritromisin, klindamisin dan kanamisin (Adimpong, dkk., 2012). Berdasarkan hasil penelitian, bakteri *Bacillus subtilis* resisten terhadap kloramfenikol dan tertrasiklin sekitar 18-64%, serta terhadap rifampisin dan streptomisin (Mazza, P, dkk, 1992; Mohammadou, dkk, 2014; Wannarat, dkk, 2014).

Penggunaan antibiotik secara oral ataupun parenteral semakin meningkat saat ini. Faktor penyebab meningkatnya penggunaan antibiotik antara lain meningkatnya angka kejadian infeksi, banyak masyarakat meminum antibiotik tidak sesuai anjuran dokter, dan penggunaan antibiotik di berbagai bagian rumah sakit yang tidak didasarkan pada indikasi sekitar 30%-80% (Mardiastuti, H.W., dkk., 2007; Kemenkes RI, 2011). Hal tersebut dapat menimbulkan permasalahan

yaitu munculnya bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik. Di Amerika Serikat, *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) melaporkan bahwa setiap tahunnya paling tidak dua juta orang menderita infeksi oleh bakteri yang resisten terhadap satu atau lebih antibiotik yang seharusnya menjadi obat pilihan untuk bakteri tersebut. Lebih dari 23.000 orang meninggal setiap tahunnya karena infeksi bakteri yang resisten terhadap antibiotik (CDC, 2013). Di Asia Tenggara, masalah resistensi antibiotik menjadi masalah nasional (WHO SEARO, 2010). Berdasarkan laporan *Review on Antimicrobial Resistance*, memperkirakan jika tidak terdapat tindakan yang efektif mengenai resistensi antibiotik, angka kematian meningkat dari 700.000/tahun menjadi 10 juta/tahun pada tahun 2050 (Brogan, D.M., Elias, M., 2016).

Seiring meningkatnya masalah resistensi antibiotik, penelitian terkait dengan pengembangan dan penemuan obat bahan alam sebagai antibiotik baru semakin meningkat. Salah satu pendekatan untuk penemuan pengobatan baru yaitu dengan menggunakan pendekatan etnofarmasi. Penelitian dengan pendekatan etnofarmasi yang dilakukan oleh Batoro dkk, (2012) di Bromo Tengger mendapatkan hasil bahwa dari 118 jenis tanaman obat yang diketahui oleh masyarakat Suku Tengger dapat menyembuhkan 60 gejala penyakit. Salah satu tanaman yang digunakan oleh Suku Tengger adalah jambu wer (*Prunus persica Sieb. & Zucc.*). Masyarakat Tengger menggunakan buah dan daun muda jambu wer yang ditumbuk halus, direbus kemudian diminum airnya untuk mengobati diare dan sariawan.

Jambu wer (*Prunus persica Sieb. & Zucc.*) termasuk dalam *family Rosaceae*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hussain, Talab dkk, (2015), daun *Prunus persica Sieb.&Zucc.* mengandung flavonoid, saponin,

glikosida, protein, steroid, tanin dan karbohidrat. Senyawa tanin, flavonoid dan saponin memiliki efek sebagai antibakteri. Tanaman dalam *family Rosaceae* diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak etanol *Prunus myrtifolia* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* CCCD-B005 dan *Candida albicans* ATCC 1023, dengan masing-masing nilai MIC/MBC adalah (0,07 ppm/0,15 ppm); (4,69 ppm/4,69 ppm) dan (4,69 ppm/9,37 ppm) (Weber, Lais Dayane, *et al*, 2014). Kemudian, penelitian yang dilakukan Aziz dan Habib, (2012) melaporkan bahwa ekstrak etanol *Prunus persica* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Staphylococcus aureus*, dengan masing-masing nilai zona hambatnya adalah 33 cm, 8 cm, dan 17 cm.

Beberapa fraksi dari *Prunus persica* Sieb & Zucc efektif untuk pengobatan disentri dan diare yang diakibatkan oleh beberapa mikroba, antara lain *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Fraksi kloroform menunjukkan penghambatan yang rendah terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Klebsiella pneumonia*, dengan masing-masing diameter hambatannya adalah (8 mm), (6 mm), dan (6mm), sedangkan fraksi petroleum eter, diklorometana, etil asetat tidak menunjukkan adanya penghambatan terhadap *Bacillus subtilis* (Aziz dan Habib, 2013). Selain itu, penelitian yang dilakukan Weber, Lais Dayane *dkk* (2014), melaporkan bahwa fraksi etanol, air, etil asetat dan heksana pada *Prunus myrtifolia* memiliki senyawa metabolit sekunder yang berbeda. Fraksi air mengandung tanin dan flavonoid, fraksi etil asetat mengandung tanin, saponin, flavonoid, dan triterpen, fraksi etil asetat mengandung flavonoid serta fraksi heksana tidak mengandung senyawa metabolit, dengan masing-masing nilai MIC/MBC terhadap bakteri *Bacillus subtilis*

adalah (3,13 ppm/6,25 ppm); (4,69 ppm/9,37 ppm); (4,69 ppm/9,38 ppm); dan (-/-) Berdasarkan pemaparan tersebut, setiap fraksi memiliki senyawa metabolit tertentu yang akan menentukan efek farmakologi dari setiap fraksinya.

Banyak informasi mengenai senyawa metabolit dan efek antimikroba dari buah *Prunus persia*. Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antimikroba dari ekstrak etanol 80% dan fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) pada bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Hal tersebut dikarenakan dari tempat pengambilan sampel buah *Prunus Persica* dengan yang ada diliteratur berbeda, sehingga senyawa metabolit yang terkandung dan efek antimikroba akan berbeda. Penelitian yang akan dilakukan yaitu melakukan ekstraksi etanol 80% buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*). Pemilihan pelarut etanol 80% dikarenakan etanol mempunyai titik didih yang rendah, aman, tidak beracun dan tidak berbahaya daripada pelarut lainnya (metanol, dietil eter, kloroform). Selain itu, memiliki daya ekstraktif terbesar untuk semua bahan alam berbobot molekul rendah seperti alkaloid, saponin dan flavonoid (Djamal, 2010). Digunakan konsentrasi 80% dikarenakan pada konsentrasi tersebut memiliki nilai rendemen ekstrak yang lebih banyak daripada konsentrasi etanol 70% dan 95% (Senja, dkk., 2014). Selanjutnya dilakukan fraksinasi dan pemeriksaan fitokimia untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) dan dilakukan uji aktivitas antimikroba pada ekstrak dan fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol dan air buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) ?
2. Apakah ekstrak etanol 80% dan fraksi (kloroform, etil asetat, n-butanol, air) buah Jambu Wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

1. Mengetahui perbedaan kandungan senyawa metabolit sekunder dari fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol dan air buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*).
2. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol 80% dan fraksi (kloroform, etil asetat, n-butanol, air) buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 19659.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui perbedaan kandungan senyawa metabolit sekunder dari fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol dan air buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) menggunakan metode KLT.
2. Mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol 80% dan fraksi (kloroform, etil asetat, n-butanol, air) buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) pada bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659 menggunakan metode mikrodilusi.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Memberikan bukti ilmiah terhadap penggunaan jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) sebagai obat diare secara empiris di Suku Tengger.
2. Pengembangan ilmu fitokimia dan mikrobiologi.
3. Dasar pengembangan ide penelitian selanjutnya mengenai manfaat buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) sebagai obat diare infeksi.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Pengembangan penelitian antibakteri baru dari jambu wer yang memiliki efek antibakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659.
2. Dapat menjadi suatu strategi terapi untuk mengatasi diare dengan menggunakan fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Antibiotik dan Resistensi Antibiotik

2.1.1 Definisi Antibiotik

Antibiotika adalah senyawa kimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme (khususnya dihasilkan oleh fungi) atau dihasilkan secara sintetik yang dapat membunuh atau menghambat perkembangan bakteri dan organisme lain (Munaf, 1994). Menurut Mims, dkk. (2004) antibiotik adalah substansi kimia yang dibentuk atau diperoleh dari berbagai mikroorganisme, yang dalam konsentrasi rendah mampu menghambat mikroorganisme lainnya.

2.1.2 Mekanisme Kerja Antibiotik

Secara umum mekanisme kerja antibiotik pada sel bakteri dapat terjadi melalui beberapa cara antara lain (Etebu, Ebimieowei dan Ibemologi A., 2016):

a. Menghambat sintesis dinding sel bakteri.

Bakteri memiliki lapisan kaku yang dinamakan peptidoglikan (PG) digunakan untuk melindungi sel dari tekanan osmotik yang konsisten. Beberapa antibiotik terutama golongan glycopeptide (contoh vancomycin) dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan menghambat sintesis dari peptidoglikan. Antibiotik tersebut menghambat peptidoglikan dengan mengikat dirinya sendiri pada unit peptidoglikan, sehingga aktivitas transglycosylase dan transpeptidase (proses sintesis peptidoglikan) terganggu.

b. Menghambat fungsi atau struktur membran.

Golongan antibiotik yang menghambat membran sel spesifik pada golongan yang memiliki perbedaan pada tipe *lipid* pada sel membrannya, contohnya adalah daptomycin dan polymyxins.

c. Menghambat sintesis asam nukleat.

Antibiotik mengganggu sintesis asam nukleat dengan menghambat replikasi atau menghentikan transkripsi. Golongan quinolones dapat mengganggu fungsi dari enzim helikase (enzim yang terlibat dalam proses replikasi DNA sehingga DNA bisa membuka).

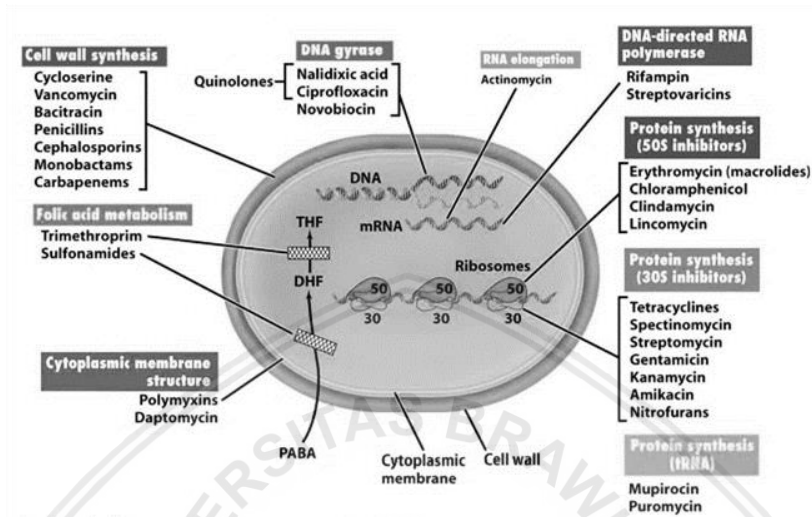
d. Menghambat sintesis protein.

Antibiotik yang menghambat sintesis protein terdiri dari 2 subkelas yaitu menghambat ribosom 50s dan 30s. Antibiotik seperti erythromycin, clindamycin, lincomycin, chloramphenicol, linezolid termasuk dalam menghambat sintesis protein pada ribosom 50s. Mekanisme kerja antibiotik yang menghambat ribosom 50s adalah menghambat fase inisiasi dari translasi protein (contoh Oxazolidinones) atau fase elongasi pada sintesis protein (contoh makrolida yaitu incosamide and streptogramin). Mekanisme kerja antibiotik yang menghambat ribosom 30s adalah menghambat akses aminoacyl-tRNAs menuju ribosom, contohnya tetracycline, streptomycin, spectinomycin. Antibiotik yang menghambat sintesis protein bersifat bakteriostatik.

e. Menghambat metabolisme folat.

Antibiotik yang menghambat sintesis asam folat pada bakteri antara lain sulphonamides dan trimethoprim. Asam folat sangat penting dalam metabolisme asam nukleat dan asam amino. Antibiotik sulphonamides dan trimethoprim bekerja dengan cara mengganggu produksi asam nukleat (DNA

dan RNA) dan asam amino dengan menirukan substrat yang diperlukan untuk metabolisme asam folat.



Gambar 2.1. Mekanisme kerja antibiotik pada bakteri (Madigan and Martinko, 2006).

Tabel 2.1. Mekanisme Kerja Antibiotik

Mekanisme Kerja	Contoh
Menghambat sintesis dinding sel bakteri	Cycloserine, vancomycin, bacitracin, penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems.
Menghambat fungsi atau struktur membran.	Polymyxins, daptomycin.
Menghambat sintesis asam nukleat	Nalidixic acid, ciprofloxacin, novobiocin (quinolones), rifampin.
Menghambat sintesis protein	Eritromycin, chloramphenicol, clindamycin, lincomycin (menghambat ribosom 50s). Tetracyclines, spectinomycin, streptomycin, gentamycin, kanamycin, amikacin, nitrofurantoin (menghambat ribosom 30s).
Menghambat metabolisme asam folat.	Trimethoprim, Sulfonamides.

2.1.3 Resistensi Antibiotik

Resistensi antibiotik merupakan tidak terhambatnya pertumbuhan bakteri dengan pemberian antibiotik secara sistemik dengan dosis normal yang seharusnya atau kadar hambat minimalnya. Resistensi terjadi ketika bakteri berubah yang dapat menyebabkan turun atau hilangnya efektivitas obat, senyawa kimia atau bahan lainnya untuk mengobati infeksi (Bari,2008).

Mekanisme terjadinya resistensi terhadap antibiotika, antara lain (Tim Mikrobiologi FKUB, 2003) :

1. Mikroba memproduksi enzim yang merusak obat.
Contoh : Stafilokokus memproduksi enzim β -laktamase yang memecah cincin β -laktam dari obat penisilin. Bakteri Gram negatif dapat menghasilkan enzim adenilase, asetilase, fosforilase yang merusak obat aminoglikosida, atau menghasilkan asetiltransferase yang merusak kloramfenikol.
2. Mikroba merusak permeabilitas membran selnya.
Contoh : resistensi mikroba terhadap obat yang bekerja menghambat sintesis protein, karena golongan obat tersebut perlu menembus membran sel bakteri untuk mencapai titik tangkap kerjanya yaitu ribosom.
3. Mikroba mengubah struktur target terhadap obat.
Contoh : resistensi bakteri terhadap obat aminoglikosida, eritromisin oleh karena terjadi perubahan pada struktur ribosom. Demikian juga hilangnya atau perubahan pada PBPs dari *Diplococcus pneumoniae*, sehingga resistensi terhadap penisilin dan sefalosporin.
4. Mikroba mengembangkan jalan metabolisme baru.
Contoh : bakteri yang resisten terhadap sulfonamid mampu mengambil asam folat dari luar selnya.
5. Mikroba mengembangkan enzim yang tetap berfungsi untuk metabolismenya, tetapi tidak dipengaruhi oleh obat.
Contoh : resistensi terhadap obat trimetoprim.
6. Mikroba memperbesar produksi bahan metabolit.
Contoh : bakteri yang resisten terhadap sulfonamid mampu menghasilkan PABA dalam jumlah besar. Keadaan ini mengakibatkan bakteri bergantung

terhadap sulfonamide untuk kelangsungan hidupnya. Mekanisme ini disebut *drug dependence*.

2.2 Jambu Wer

2.2.1 Klasifikasi

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Superdivisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Subkelas	: <i>Rosidae</i>
Ordo	: <i>Rosales</i>
Famili	: <i>Rosaceae</i>
Genus	: <i>Prunus</i>
Spesies	: <i>Prunus persica Sieb.&Zucc</i>

2.2.2 Morfologi

Pohon *Prunus persica Sieb&Zucc.* memiliki sekitar tinggi 5 sampai 10 m yang hidup pada daerah panas dan umumnya dibudidayakan di Asia Barat, Eropa, Himalaya dan India sampai ketinggian 1000 kaki. Terdapat sekitar 100 marga dan 3.000 spesies dalam keluarga Rosaceae. Masyarakat suku Tengger menyebut tumbuhan buah *Prunus persica Sieb&Zucc.* dengan buah jambu wer (Hidayat dkk., 2011). Daun *Prunus persica Sieb&Zucc* bewarna hijau berbentuk eliptik (oval) seperti pisau bedah dengan ukuran sekitar 4-8 inci, termasuk daun yang dapat meranggas. Daun *Prunus persica Sieb&Zucc* biasanya memiliki kelenjar yang

dapat mengeluarkan getah untuk menarik perhatian semut atau serangga lainnya. Bunga *Prunus persica* Sieb&Zucc muncul sebelum bulan april dengan bentuk tunggal, semi-ganda dan ganda bewarna mulai dari putih hingga merah tua. Buah *Prunus persica* Sieb&Zucc berbentuk bulat dengan panjang sekitar 3 sampai 6 inci bewarna merah kekuningan (Gilman, Edward F., dan Dennis G. W., 1994; Encyclopaedia Britannica, 2018).



(a)



(b)

Gambar 2.2. (a) Buah dan (b) Bunga jambu wer (*Prunus persica* Sieb&Zucc.)

2.2.3 Kandungan Metabolik Sekunder

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak buah *Prunus persica* Sieb.&Zucc adalah *nitrile glycosides*, seperti prunasin dan amygdalin. Pada bagian batang mengandung beta sitosterol, D-glukoside, hentriacontane, hentriacontanol, flavonoid naringenin, dihydrokaempferol, kaempferol dan quercetin (Khare, C.P., 2007). Daun *Prunus persica* Sieb.&Zucc mengandung flavonoid, saponin, glikosida, protein, steroid, tanin dan karbohidrat (Hussain, Talab, *et al*, 2015).

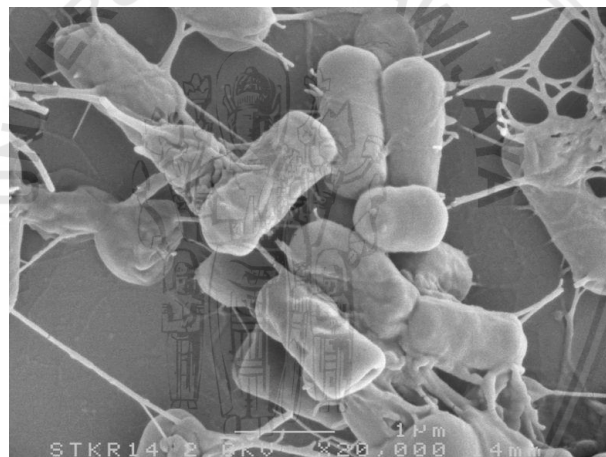
2.2.4 Aktivitas Farmakologi

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Batoro, dkk (2011) di Bromo Tengger Semeru Jawa Timur didapatkan hasil bahwa buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) digunakan sebagai obat diare. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada daun *Prunus persica Sieb.&Zucc* adalah flavonoid, saponin, glikosida, protein, steroid, tanin dan karbohidrat. Saponin digunakan untuk hiperkolesteromia, antioksidan, antikanker, antiinflamasi. Flavonoid merupakan komponen fenolik yang digunakan sebagai antioksidan. Saponin digunakan sebagai terapi hipotensi dan *cardiodepressant*. Glikosida digunakan sebagai terapi HF dan aritmia (Hussain, Talab, *et al*, 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Raturi, dkk (2011) melaporkan bahwa ekstrak metanol dari kulit *Prunus persica* memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* dan bakteri Gram negatif *Klebsiella pneumonia*, *Mycobacterium smegmatis*, dengan masing-masing diameter penghambatannya adalah (22-23.5 mm), (15-19 mm), (15.5-18.5 mm), dan (23-25 mm), (16-18 mm). Selain itu, penelitian yang dilakukan Aziz dan Habib (2013) melaporkan bahwa fraksi petroleum eter memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, dengan masing-masing diameter penghambatannya adalah (33 m), (8 mm), (9 mm), (17 mm), fraksi diklorometan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexenari*, dengan masing-masing diameter penghambatannya adalah (17 mm), (21 mm), (8 mm),(9mm), fraksi kloroform memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis*, dengan masing-masing diameter penghambatannya adalah (8 mm), (6 mm), (6 mm).

2.3 Bakteri *Bacillus subtilis*

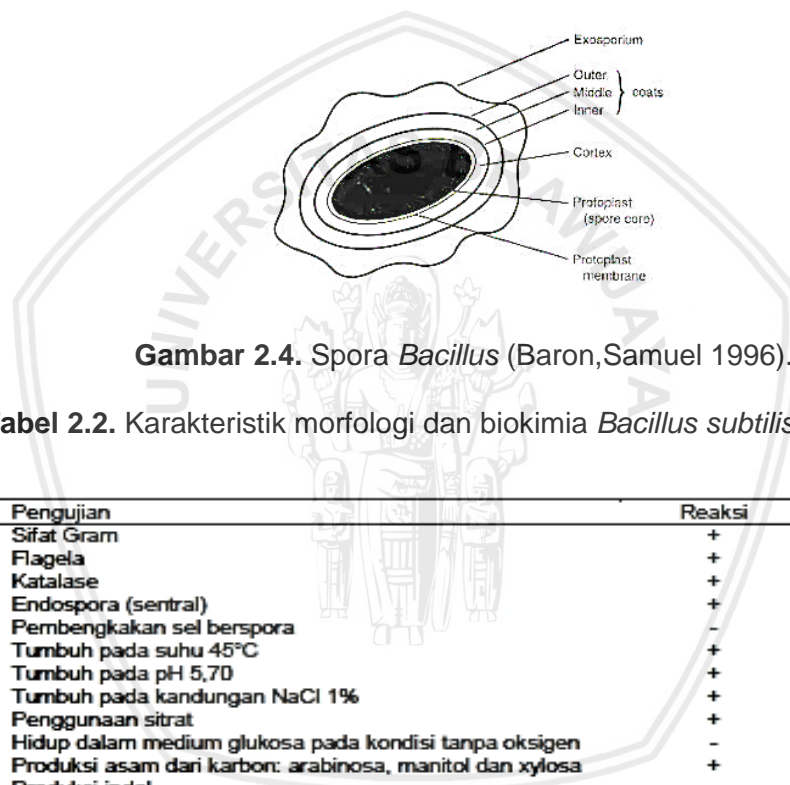
Domain : Bacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : *Bacillales*
Famili : *Bacillaceae*
Genus : *Bacillus*
Spesies : *B. subtilis*



Gambar 2.3 Bakteri *Bacillus subtilis* menggunakan mikroskop elektron

Bacillus subtilis merupakan bakteri Gram positif yang dapat membentuk endospora yang berbentuk oval di bagian sentral sel. Sel *Bacillus* spp. berbentuk batang, berukuran $0,3-2,2 \times 1,2-7,0 \mu\text{m}$, mempunyai flagel peritrikus, bersifat aerob atau anaerob fakultatif serta heterotrof, katalase positif, sel gerak yang membentuk endospora elips lebih tahan daripada sel vegetatif terhadap panas, kering dan faktor lingkungan lain yang merusak. Bakteri *Bacillus subtilis* sensitif terhadap antibiotik penicillin G, ampicillin, methicillin, dan cephatolin (Coonrod, dkk., 1971). Antibiotik yang dapat digunakan pada infeksi bakteri *Bacillus* ssp

antara lain eritromisin, klindamisin dan kanamisin (Adimpong, dkk., 2012). Bakteri *Bacillus* mempunyai daya resisten terhadap anti mikroba dan dapat menghasilkan bakteriosin yang dapat melawan bakteri lainnya, sehingga bakteri ini mampu bertahan di dalam saluran pencernaan (Aini *et al.* 2013; Soesanto 2008). *Bacillus subtilis* resisten terhadap eritromisin, linkomisin, sefalosporin, sikloserin, kloramfenikol, tetrasiklin, streptomisin dan neomisin (Barbosa dkk, 2005).



Gambar 2.4. Spora *Bacillus* (Baron, Samuel 1996).

Tabel 2.2. Karakteristik morfologi dan biokimia *Bacillus subtilis*

Pengujian	Reaksi
Sifat Gram	+
Flagela	+
Katalase	+
Endospora (sentral)	+
Pembengkakan sel berspora	-
Tumbuh pada suhu 45°C	+
Tumbuh pada pH 5,70	+
Tumbuh pada kandungan NaCl 1%	+
Penggunaan sitrat	+
Hidup dalam medium glukosa pada kondisi tanpa oksigen	-
Produksi asam dari karbon: arabinosa, manitol dan xylosa	+
Produksi indol	-
VP test	+
Hidrolisis pati	+
Hidrolisis gelatin	+

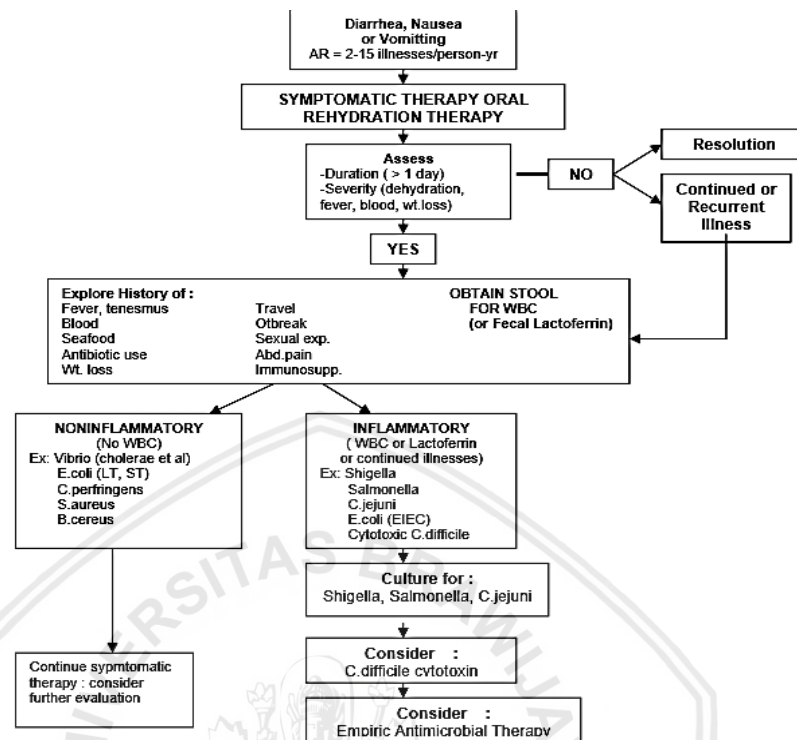
Sumber: Leary dan Chun (1988) dalam Supriadi (2006); Aini *et al.* (2013)

2.3.1 Manifestasi Klinis

Bakteri *Bacillus subtilis* dapat menyebabkan endocarditis, meningitis, infeksi pada mata, telinga, saluran pernafasan, saluran urinaria, dan saluran pencernaan. Selain itu, bakteri *Bacillus subtilis* dapat menyebabkan diare dan nyeri pada bagian perut selama 1-14 jam akibat kontaminasi makanan. Makanan/minuman yang terkontaminasi spora, akan mengalami germinasi di

dalam saluran cerna dan menghasilkan enterotoksin. Enterotoksin ini akan mempengaruhi usus yang dapat menyebabkan diare. Diare yang diakibatkan dari spora bakteri masih bertahan dan berkembang pada saat proses pemasakan atau pasteurisasi. Diare yang diakibatkan *Bacillus cereus* diakibatkan bakteri menghasilkan toksin yaitu cereolysin pada saat multiplikasi di makanan, namun pada spesies *Bacillus* lainnya tidak diketahui toksin yang dihasilkan (Tim Mikrobiologi FKUB, 2003 ; Baron, Samuel 1996).

Bakteri *Bacillus subtilis* secara komersial digunakan untuk biopestisida agar patogen tular tanah yang menyebabkan penyakit pada tanaman dapat terkendali. Oleh karena itu, sayur ataupun buah yang menggunakan biopestisida tersebut tidak dicuci sampai kadar bakterinya sedikit akan menimbulkan kontaminasi pada makanan yang menyebabkan diare. Gejala biasanya dirasakan setelah 24-48 jam. Dosis infeksi sekitar 10^4 - 10^9 sel/gram makanan. Diare disebabkan karena bakteri tersebut menghasilkan toksin yang akan merusak integritas dari membran sel epitel ileal (Logan, N.A., 2011).



Gambar 2.5. Pendekatan umum Diare infeksi Bakteri (Ciesla WP, dkk 2003).

Pemberian antibiotik secara empiris jarang diindikasikan pada diare akut infeksi, karena 40% kasus diare infeksi sembuh kurang dari 3 hari tanpa pemberian antibiotik. Pemberian antibiotik di indikasikan pada pasien dengan gejala dan tanda diare infeksi seperti demam, feses berdarah, leukosit pada feses, mengurangi ekskresi dan kontaminasi lingkungan, persisten atau penyelamatan jiwa pada diare infeksi, diare pada pelancong, dan pasien *immunocompromised*. Pemberian antibiotik secara empiris dapat dilakukan tetapi terapi antibiotik spesifik diberikan berdasarkan kultur dan resistensi kuman (Ciesla WP, dkk 2003). Terapi antibiotik untuk bakteri Gram positif antara lain glycopeptides, cephalosporin generasi pertama, penicillinase-resistant penicillins, clindamycin, quinupristin/dalfopristin, and linezolid (Paul, dkk., 2005). Antibiotik bacitracin efektif untuk bakteri Gram positif, namun resisten terhadap bakteri *Bacillus subtilis*.

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah metode pemisahan dari tanaman obat dengan menggunakan pelarut selektif melalui prosedur standart. Selama proses ekstraksi, pelarut menyebar ke dalam bagian tanaman dan melarutkan senyawa metabolit yang memiliki polaritas yang sama. Senyawa metabolit pada tanaman yang dapat dipisahkan dengan metode ekstraksi antara lain alkaloid, glikosida, terpenoid, flavonoid dan lignin (Pandey, Amita dan Shalini T., 2013).

Tabel 2.3. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi senyawa metabolit sekunder

(Pandey, Amita dan Shalini T., 2013).

Air	Etanol	Metanol	Kloroform	Eter	Aseton
Antosianin	Tanin	Antosianin	Terpenoid	Alkaloid	Fenol
Starches	Polifenol	Terpenoid	Flavonoid	Terpenoid	Flavonol
Tanin	Polycetylenes	Tanin		Kumarin	
Saponin	Flavonol	Saponin		<i>Fatty acids</i>	
Terpenoid	Terpenoid	Xanthoxylline			
Polipeptida	Sterol	Totarol			
Lektin	Alkaloid	Quassinoid			
		Lakton			
		Flavon			
		Phenon			
		Polifenol			

2.4.1 Jenis Ekstraksi

2.4.1.1 Ekstraksi Dingin

Metode ini tidak ada proses pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung untuk menghindari rusaknya senyawa pada saat proses pemanasan.

2.4.1.1.1 Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dilakukan melalui perendaman serbuk bahan dalam larutan pengeksrak. Metode ini digunakan untuk mengekstrak zat aktif yang mudah larut dalam cairan pengeksrak, tidak mengembang dalam pengeksrak, serta tidak mengandung benzoin. Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya mudah ditemukan dan pengerjaannya sederhana (Hargono dkk., 1986). Lama maserasi memengaruhi kualitas ekstrak yang akan diteliti. Lama maserasi pada umumnya adalah 4-10 hari. Menurut Voight (1995), maserasi akan lebih efektif jika dilakukan proses pengadukan secara berkala karena keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Melalui usaha ini diperoleh suatu keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat masuk ke dalam cairan pengeksrak. Menurut Harborner (1987), metode maserasi digunakan untuk mengekstrak jaringan tanaman yang belum diketahui kandungan senyawanya yang kemungkinan bersifat tidak tahan panas sehingga kerusakan komponen tersebut dapat dihindari, serta penggunaan metode ini menggunakan prinsip kelarutan.

2.4.1.1.2 Perkolasi

Perkolasi biasanya digunakan pada *tincture* dan ekstrak cair. Bahan yang akan diekstraksi dibasahi dengan beberapa *menstruum* yang spesifik dan dibiarkan selama 4 jam pada wadah yang tertutup. *Menstruum* ditambahkan untuk

membuat lapisan yang dangkal dan kemudian didiamkan selama 24 jam pada perkolator. Kemudian saluran tetesan dibuka dan larutan yang terdapat didalamnya diteteskan secara perlahan sambil ditambahkan *menstruum* sampai seperempat dari volume produk akhir yang diinginkan (Pandey, Amita dan Shalini T., 2013).

2.4.1.1.3 Sonikasi

Sonikasi menggunakan *ultrasonic* dengan frekuensi antara 20 KHz sampai 2000 KHz untuk meningkatkan permeabilitas dinding sel dan membentuk rongga. Kerugian dari metode sonikasi adalah merusak konstituen obat dikarenakan energi dari ultrasonik melalui pembentukan radikal bebas sehingga dapat menyebabkan perubahan pada molekul pada obat (Pandey, Amita dan Shalini T., 2013).

2.4.1.2 Ekstraksi Panas

Metode ini melibatkan panas selama proses ekstraksi. Dengan adanya panas akan mempercepat proses ekstraksi daripada dengan cara dingin.

2.4.1.2.1 Infusa

Infusa dilakukan dengan cara maserasi tanaman dengan waktu yang singkat dengan air dingin atau dengan air mendidih (Pandey, Amita dan Shalini T., 2013).

2.4.1.2.2 Dekokta

Dekokta digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang larut dalam air dan stabil dengan pemanasan, kemudian tanaman akan dididihkan di air selama 15

menit dan diberikan air dingin yang cukup untuk menghasilkan volume yang diinginkan (Pandey, Amita dan Shalini T., 2013).

2.5 Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu metode pemisahan senyawa organik berdasarkan kelarutan senyawa-senyawa tersebut dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur, biasanya antara pelarut air dan pelarut organik (Soebagio, Rusdiana, dan Kairudin, 2007). Teknik pemisahan cairan ini dilakukan dengan menggunakan corong pisah.

2.5.1 Fraksinasi Cair-Cair

Fraksinasi cair-cair merupakan suatu pemisahan yang didasarkan pada perbedaan kelarutan antar 2 komponen pelarut yang tidak saling bercampur. Alat yang digunakan adalah corong pisah. Prinsip fraksinasi didasarkan pada distribusi zat terlarut dan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling campur (Harborne, 1987). Kedua pelarut yang tidak saling bercampur dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian dikocok dan dibiarkan. Senyawa organik akan terdistribusi ke dalam fasanya masing-masing tergantung pada kelarutannya terhadap fase tersebut dan kemudian akan terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan atas dan lapisan bawah yang dapat dipisahkan dengan membuka kunci pipa corong pisah (Odugbemi, 2008).

2.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis merupakan suatu proses pemurnian dan identifikasi senyawa kimia pada tanaman obat. Prinsip KLT adalah pemisahan komponen berdasarkan distribusinya pada fase diam dan fase gerak

(Adnan,1997). Eluen atau fase gerak pada KLT merupakan suatu medium angkut yang terdiri dari satu atau campuran pelarut tunggal. Pemilihan pelarut sebagai fase gerak menentukan pemisahan dari suatu senyawa.

Senyawa diidentifikasi berdasarkan penampakan dan nilai Rf-nya (jarak relatif komponen terhadap jarak pelarut) yang kemudian dibandingkan dengan noda standart untuk analisis kualitatifnya. Nilai Rf yaitu perbandingan jarak yang ditempuh senyawa dengan jarak yang ditempuh pelarut. Nilai RF khas untuk senyawa tertentu (Khopkar,2002).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh zat yang diteliti}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

2.7 Uji Aktivitas Bakteri

2.7.1 Metode Dilusi

2.7.1.1 Dilusi broth

Metode ini digunakan untuk mengukur MIC atau kadar hambat minimum dan MBC atau kadar bunuh minimum. Cara yang dilakukan adalah dengan memberi seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair minimal 2 mL yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya di kultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi, 2008; OIE, 2012).

2.7.1.1.1 Mikrodilusi

Mikrodilusi merupakan metode yang digunakan untuk menguji banyak antimikroba dalam satu percobaan mikrodilusi. Pada saat percobaan, agen antimikroba akan terdilusi dengan berbagai seri pada setiap *plate* agar, dengan memindahkan campuran suspensi antar *plate* satu ke *plate* lainnya. Kemudian diinkubasi untuk melihat pertumbuhan bakteri pada setiap *plate*, sehingga dapat diukur MIC (Carpenter, Darcie E., dkk, 2018).

2.7.1.2 Dilusi agar

Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (soil). Keuntungan metode ini adalah suatu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji. Dilusi agar direkomendasikan untuk metode standarisasi AST untuk bakteri *anaerob* dan spesies *Helicobacter* (Pratiwi, 2008; OIE, 2012).

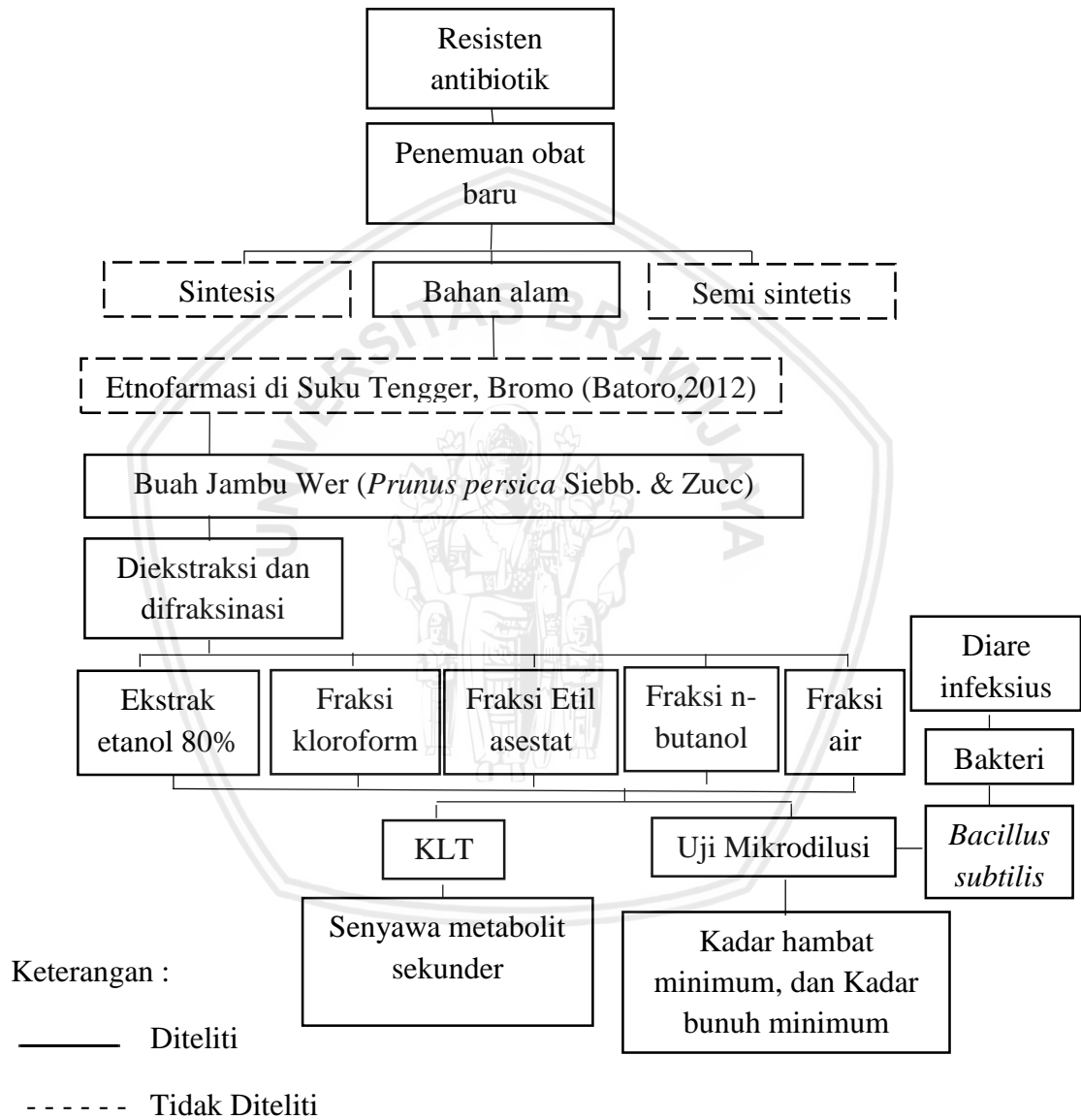
2.7.2 Metode difusi disk

Metode difusi *disk* digunakan untuk mengetahui konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. Dikatakan dapat menghambat bakteri uji jika terdapat zona inhibisi disekitar *disk* sampel. Umumnya semakin besar zona inhibisi, semakin rendah konsentrasi antimikroba yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Namun, tergantung pada konsentrasi antibiotik dalam *disk* dan kemampuan untuk berdifusinya (OIE, 2012).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

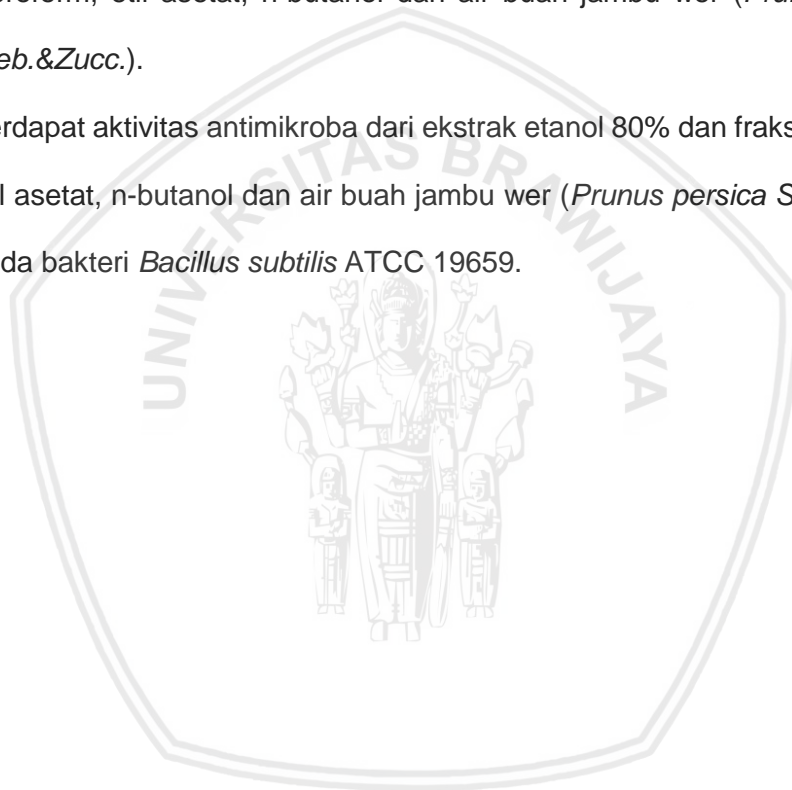
Penelitian dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol 80% dan fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) pada bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Penelitian ini dilatarbelakangi oleh banyaknya masalah resistensi antibiotik saat ini. Oleh karena itu, perlu ditemukan obat baru yang memiliki potensi sebagai antibakteri. Senyawa baru yang memiliki aktivitas antibakteri dapat berasal dari senyawa sintetis, semi sintetis, dan bahan alam. Salah satu pendekatan yang dilakukan untuk mendapatkan senyawa baru yang berasal dari bahan alam, adalah dengan menggunakan pendekatan entnofarmasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Batoro, dkk. (2011) melaporkan bahwa buah jambu wer (*Prunus persica Sieb & Zucc.*) banyak dipergunakan pada Suku Tengger, Jawa Timur sebagai obat anti diare. Namun belum terdapat penelitian terkait aktivitas dari jambu wer (*Prunus persica ieb.&Zucc.*) baik secara *in vitro*, *in vivo* maupun secara klinis.

Diare digolongkan menjadi 2 jenis, yaitu diare infeksi dan diare non infeksi. Diare infeksi dapat disebabkan akibat adanya bakteri, virus dan parasit. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan diare adalah *Bacillus suntilis*. Dalam penelitian ini, buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) akan di ekstrak dengan etanol 80% dan di fraksinasi dengan fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol dan air. Kemudian dilakukan analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk melihat senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak dan fraksi, serta uji antibakteri untuk melihat aktivitas antibakteri pada *Bacillus subtilis* ATCC 19659 untuk melihat ekstrak dan fraksi yang paling potensial sebagai antibakteri. Kemudian dari penelitian ini akan didapatkan Kadar hambat Minimum (KHM), Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak dan fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*). Pada akhirnya dapat dibuktikan bahwa ekstrak etanol 80%

dan fraksi buah jambu wer (*Prunus persica* Sieb.&Zucc.) dapat menghambat aktivitas bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659 yang menyebabkan diare infeksi.

3.2 Hipotesis

1. Terdapat perbedaan senyawa metabolit yang terkandung pada fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol dan air buah jambu wer (*Prunus persica* Sieb.&Zucc.).
2. Terdapat aktivitas antimikroba dari ekstrak etanol 80% dan fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol dan air buah jambu wer (*Prunus persica* Sieb.&Zucc.) pada bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian laboratorium secara *in vitro*, yaitu menguji efek antimikroba ekstrak dan fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Desain penelitian yang digunakan adalah *true experimental in vitro, post test design*, dan *controle group design*. Pengujian efek antimikroba dilakukan dengan uji mikrodilusi untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM).

4.2 Sampel Penelitian

Sampel kultur bakteri yang digunakan untuk penelitian ini adalah sampel kultur bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sampel buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*) diperoleh dari Suku Tengger, Bromo, Jawa Timur.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri adalah konsentrasi ekstrak etanol 80% buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*), konsentrasi fraksi kloroform, konsentrasi fraksi n-butanol, konsentrasi fraksi etil asetat, dan konsentrasi fraksi air.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada pengujian aktivitas antibakteri adalah Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Nilai KHM didapat dari nilai persen hambatan bakteri yang diperoleh dari nilai rerata *Optical Density* (OD) sampel ekstrak etanol 80% buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc*), fraksi kloroform, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, fraksi air, dan suspensi bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Nilai KBM diperoleh dari pengamatan secara visual pada media agar.

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada pengujian aktivitas antibakteri adalah proses ekstraksi, pelarut, proses fraksinasi, dan metode uji antibakteri yaitu metode mikrodilusi.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2017 sampai Maret 2018 .

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan adalah vortex (IKA®), lempeng KLT (silica GF_{254nm}), oven (MEMMERT™), spuit injeksi 1 mL (ONE MED®), pipet volume,

overheat stirrer, mikropipet (SOCOREX™), tip, mikrotube, kulkas (Toshiba MEZ65529754), timbangan analitik (SHIMAZU UAW220), Hotplate (IKA® C-MAG HS 7), spektrofotometer (AMTAST AMV 10 PC), incubator (MEMMERT™), autoklaf (*electric vertical* Gea LS-B100), dan ELISA reader (Multiscan GO).

4.5.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc*), etanol, kloroform, n-butanol, akuades, etil asetat, aseton, n-heksana, asam formiat, methanol, penampak noda dragendorf, penampak noda H₂SO₄ 10%, KOH 10%, anisaldehyd asam sulfat, FeCl₃, Amonia, media Muller Hinton Broth (MERCK), Nutrient Agar (MERCK), Nutrient Broth (MERCK), bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659, DMSO, *Water For Injection* (WFI) dan antibiotik seftriakson (HEXPHARM JAYA) .

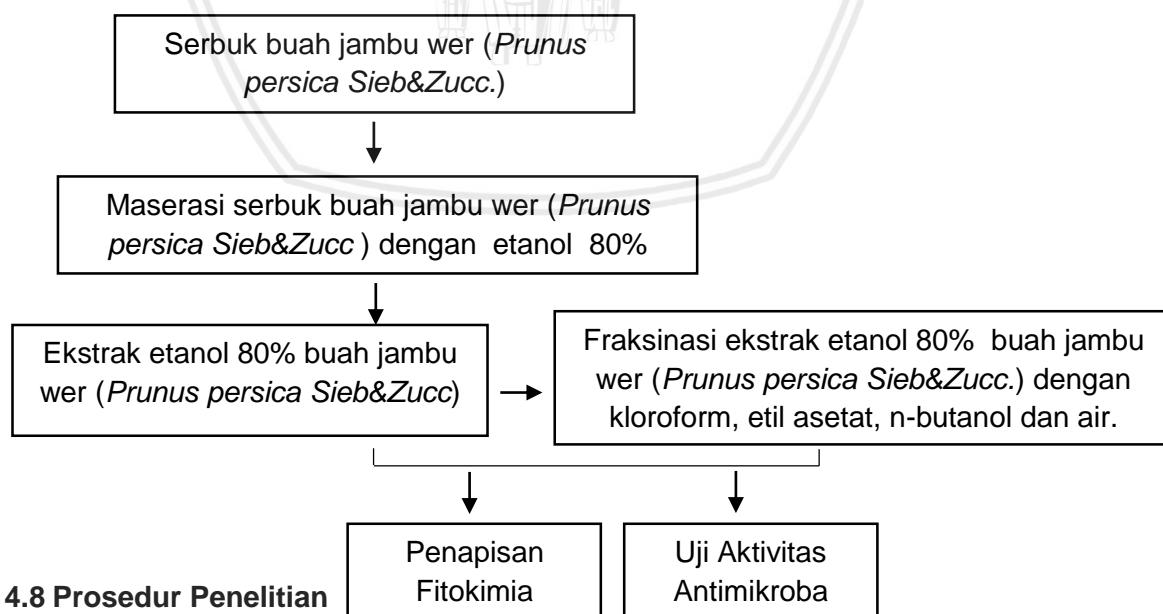
4.6 Definisi Operasional

1. Bakteri *Bacillus subtilis* merupakan bakteri Gram positif dengan kode isolat ATCC 19659 yang diperoleh dari stok kultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) diperoleh dari buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) di Suku Tengger, Malang.
3. Ekstrak buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) merupakan simplisia buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) yang diekstraksi dengan etanol 80%.
4. Fraksinasi ekstrak etanol 80% buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) merupakan ekstrak jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc*)

dilakukan dengan berbagai macam pelarut, yaitu etanol, n-butanol, etil asetat dan air untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder berdasarkan kepolarannya.

5. Metode pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 80% dan fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) adalah metode pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 80% dan fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc*) terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 19659 menggunakan metode mikrodilusi dan *swab*. Kemudian mengukur Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM).
6. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar minimal yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi minimal sampel uji dapat menghambat bakteri sebesar 99% atau 100% pada media agar.

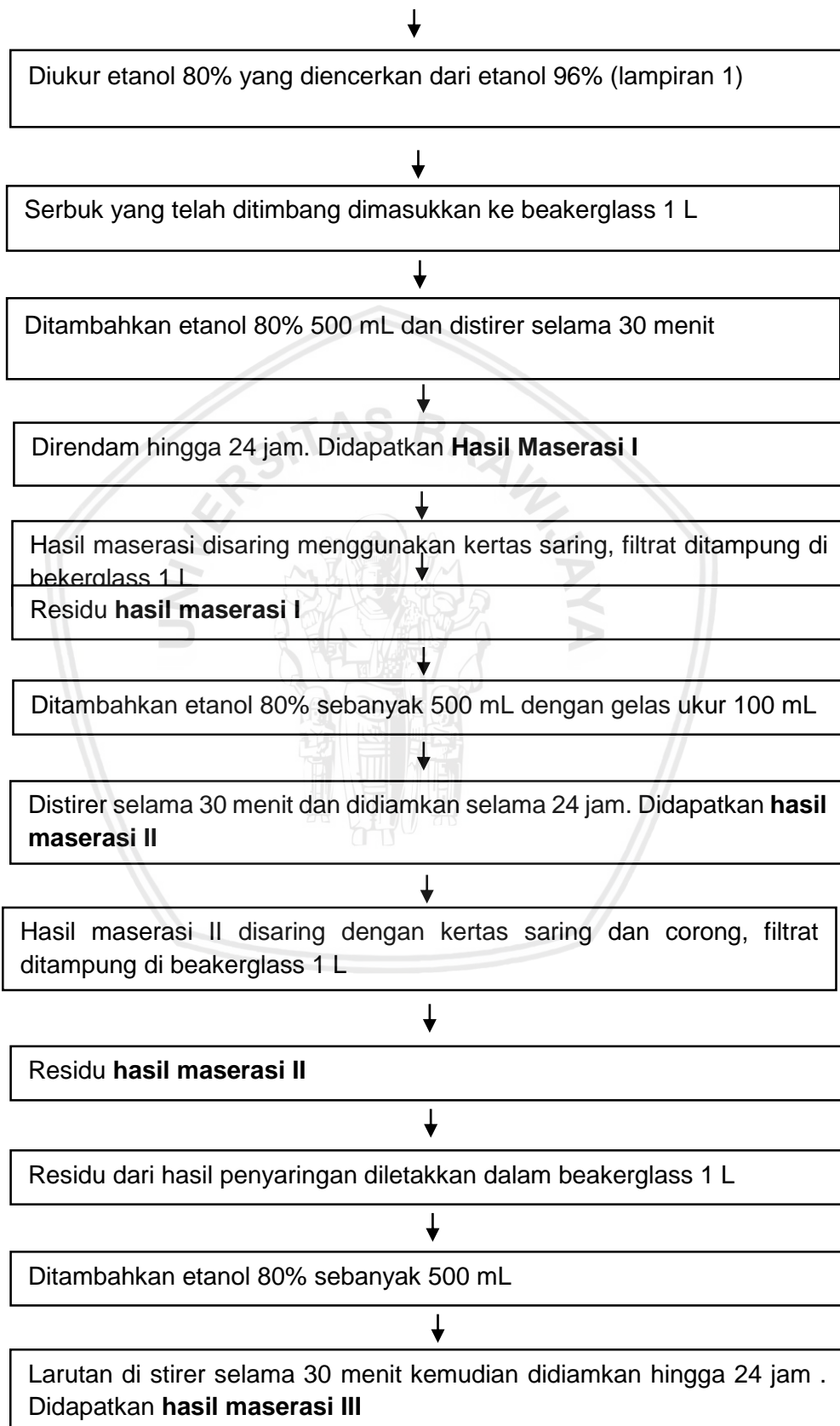
4.7 Alur Penelitian

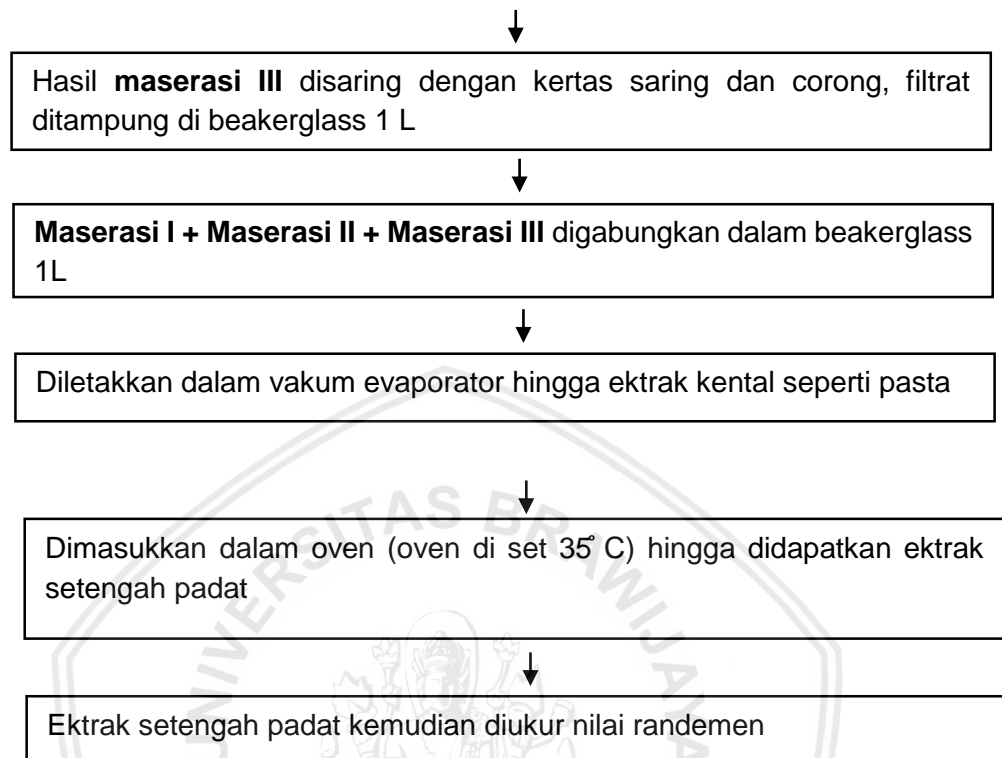


4.8 Prosedur Penelitian

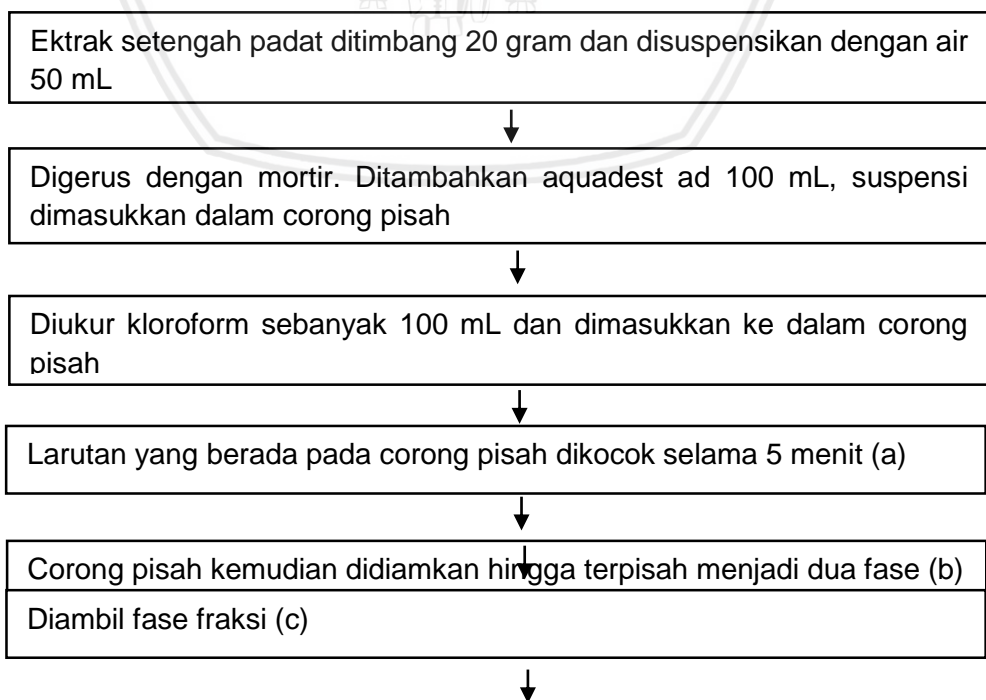
4.8.1 Maserasi Jambu Wer (*Prunus persica Sieb.&Zucc.*)

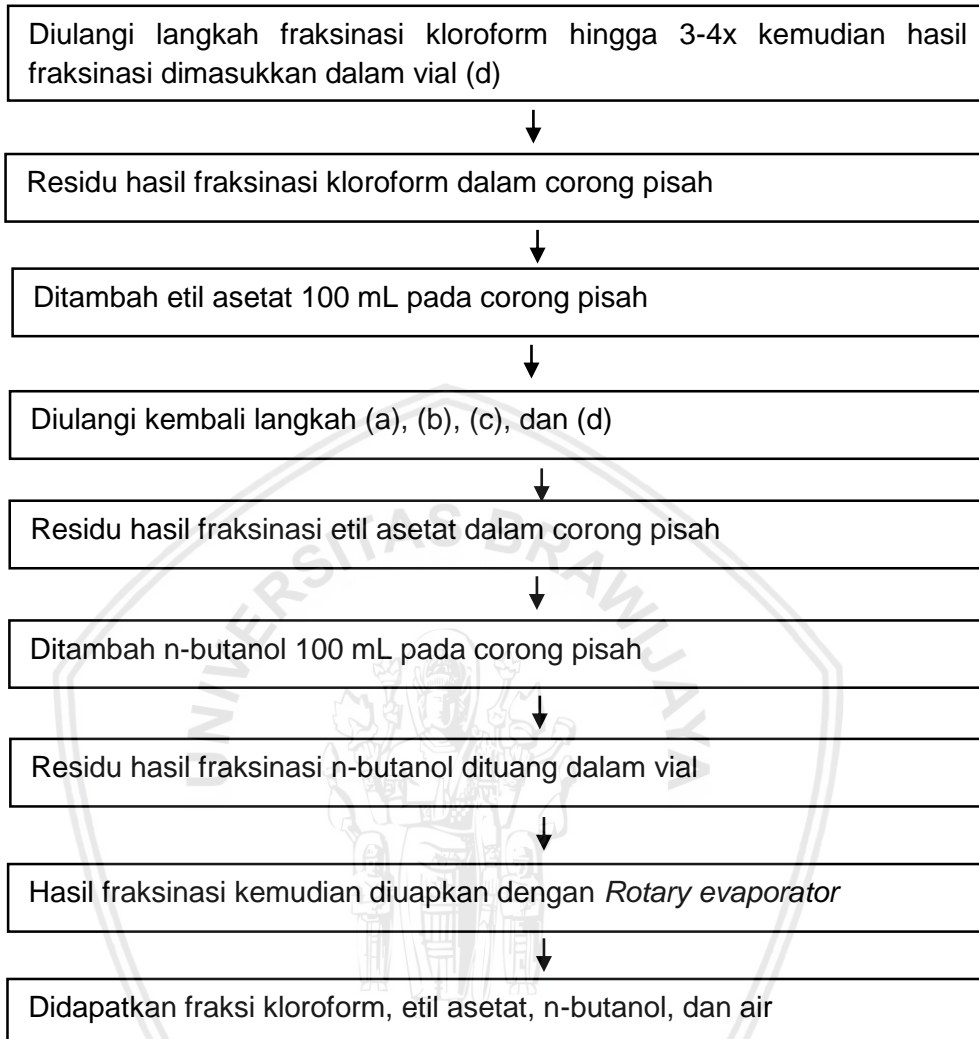
Serbuk buah jambu wer ditimbang 151,8 gram





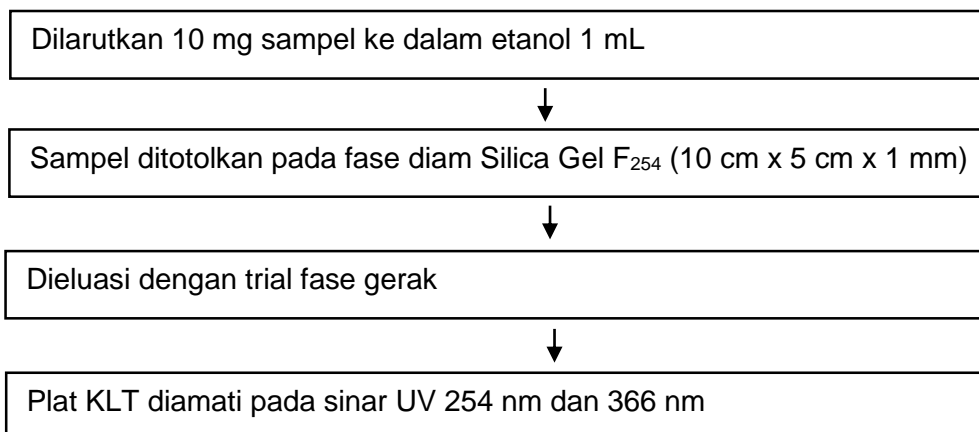
4.8.2 Fraksinasi Ekstrak Etanol 80% Buah Jambu Wer (*Prunus persica* Sieb.&Zucc)





4.8.3 Identifikasi senyawa metabolit dengan KLT

4.8.3.1 Optimasi pelarut



Tabel 4.1. Percobaan Fase Gerak untuk Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Trial	Pelarut
1	Kloroform : Aseton : Asam formiat (2 : 7,5 : 0,5)
2	Kloroform : Aseton (4 : 6)
3	Kloroform : Aseton (3 : 7)
4	Kloroform : Aseton (2 : 8)
5	N-heksana : Etil asetat (3 : 7)
6	N-heksana : Etil asetat (1 : 9)

4.8.3.2 Identifikasi senyawa metabolit

4.8.3.2.1 Antrakuinon

Dilarutkan 10 mg sampel ke dalam etanol 1 mL



Sampel ditotolkan pada fase diam Silica Gel F₂₅₄ (10 cm x 5 cm x 1 mm)



Dieluasi dengan fase gerak etil asetat : metanol : akuades (100:13,5: 10).



Plat KLT diamati pada sinar UV 254 nm dan 366 nm



Diberi penampak noda KOH 10%



Plat diamati pada sinar 366 nm dan cahaya tampak

4.8.3.2.2 Flavonoid

4.8.3.2.2.1 Penampak noda H₂SO₄

Dilarutkan 10 mg sampel ke dalam etanol 1 mL

↓

Sampel ditotolkan pada fase diam Silica Gel F₂₅₄ (10 cm x 5 cm x 1 mm)

↓

Dieluasi dengan fase gerak n-butanol : etil asetat (1 : 9)

↓

Diberi penampak noda H₂SO₄

↓

Plat diamati pada sinar 366 nm dan cahaya tampak

4.8.3.2.2 Penampak noda uap amonia

Dilarutkan 10 mg sampel ke dalam etanol 1 mL

↓

Sampel ditotolkan pada fase diam Silica Gel F₂₅₄ (10 cm x 5 cm x 1 mm)

↓

Dieluasi dengan fase gerak etil asetat : aseton (2 : 8).

↓

Plat KLT diamati pada sinar UV 254 nm dan 366 nm

↓

Diberi penampak noda uap amonia

↓

Plat diamati pada cahaya tampak

4.8.3.2.3 Terpenoid

Dilarutkan 10 mg sampel ke dalam etanol 1 mL

↓

Sampel ditotolkan pada fase diam Silica Gel F₂₅₄ (10 cm x 5 cm x 1 mm)

↓

Dieluasi dengan fase gerak n-butanol : etil asetat (1 : 9)



Diberi penampak noda anisaldehyd asam sulfat



Plat diamati pada sinar 366 nm dan cahaya tampak

4.8.3.2.4 Tanin dan Polifenol

4.8.3.2.4.1 Pereaksi Warna

4.8.3.2.4.1.1 Gelatin 10%

Dilarutkan 10 mg sampel ke dalam etanol 1 mL



Ditambahkan 3 tetes gelatin 10%



Diamati adanya endapan bewarna putih

4.8.3.2.4.1.2 FeCl₃

Dilarutkan 10 mg sampel ke dalam etanol 1 mL



Ditambahkan 3 tetes FeCl₃



Diamati perubahan warna (hijau kehitaman)

Dilarutkan 10 mg sampel ke dalam etanol 1 mL



Sampel ditotolkan pada fase diam Silica Gel F₂₅₄ (10 cm x 5 cm x 1 mm)



Dieluasi dengan fase gerak n-butanol : etil asetat (1 : 9)



Diberi penampak noda FeCl_3



Plat diamati pada cahaya tampak

4.8.3.2.5 Alkaloid

Dilarutkan 10 mg sampel ke dalam etanol 1 mL



Sampel ditotolkan pada fase diam Silica Gel F_{254} (10 cm x 5 cm x 1 mm)



Dieluasi dengan fase gerak n-butanol : etil asetat (1 : 9)



Diberi penampak noda dragendrof



Plat diamati pada cahaya tampak

4.8.4 Uji Antibakteri dengan Mengukur Kadar Hambat Minimum dan Kadar Bunuh Minimum (Metode Mikrodilusi)

4.8.4.1 Preparasi Bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659

Alat disterilkan pada autoklaf suhu 121°C selama 20 menit, ose dan pinset dibakar, pembakaran di atas api langsung



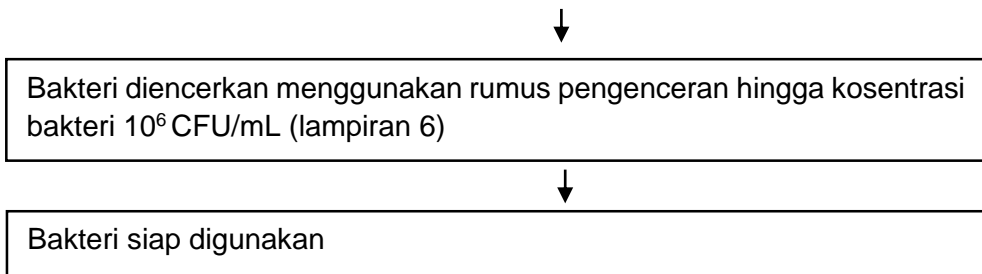
Bakteri ditumbuhkan pada media agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C



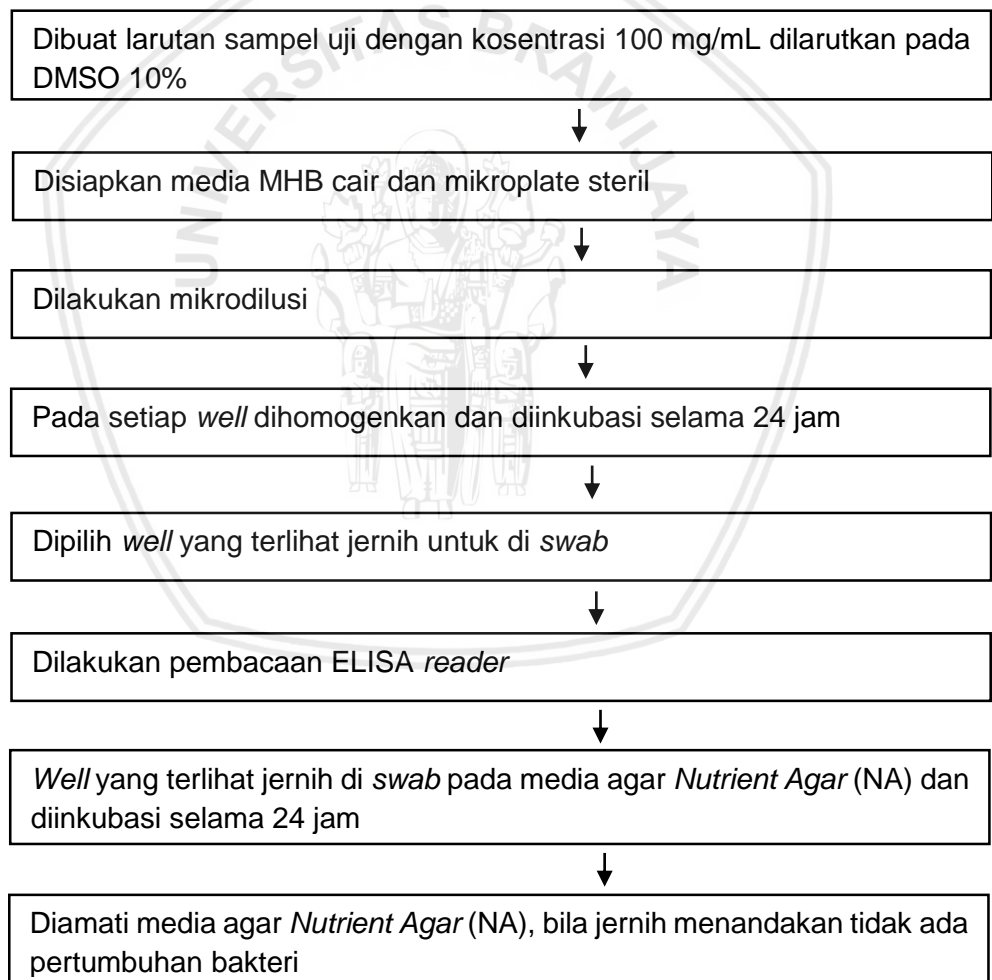
Diambil satu ose koloni bakteri dan ditumbuhkan kembali pada media cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C



Suspensi bakteri diukur absorbansinya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 620 nm.



4.8.4.2 Mikrodilusi



Kontrol positif dan negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibiotik seftriakson dan larutan DMSO 10%.

4.9 Analisis Data

Nilai *Optical Density* (OD) yang diperoleh kemudian dilakukan perhitungan menggunakan rumus persen hambatan. Nilai OD pada rumus merupakan nilai OD rata-rata yang diperoleh dari dua replikasi. Persentase hambatan yang diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan nilai KHM sampel. Nilai KBM diperoleh dari pengamatan secara visual pada media agar. Rumus yang digunakan untuk menghitung persen penghambatan bakteri, sebagai berikut :

$$\% \text{ Hambatan} = \left(\frac{OD \text{ Kontrol Negatif} - OD \text{ Sampel Uji}}{OD \text{ Kontrol Negatif}} \right) \times 100\%$$

Keterangan :

$OD_{\text{Kontrol Negatif}}$ = Rerata Kontrol Negatif.

$OD_{\text{Sampel Uji}}$ = Rerata (Suspsi bakteri 50 μL + MHB 50 μL + Sampel Uji 50 μL) – Rerata (MHB 50 μL + Sampel Uji 50 μL + MHB 50 μL).

$OD_{\text{Kontrol positif}}$ = Rerata (Suspsi bakteri 50 μL + MHB 50 μL + Seftriakson 50 μL) – Rerata (MHB 50 μL + Sampel Uji 50 μL + MHB 50 μL).

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Ekstraksi Buah Jambu Wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc.)

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 80%. Hasil dari maserasi dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Persentase Rendemen Ekstrak

Ekstrak	Berat Simplisia Serbuk	Berat Hasil Ekstraksi	Rendemen	Warna
Etanol 80%	151,08 gram	56,88 gram	37,65%	Coklat

5.2 Fraksinasi Ekstrak Etanol 80% Buah Jambu Wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc.)

Setelah proses maserasi, dilanjutkan dengan fraksinasi cair-cair. Pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi ini yaitu kloroform, etil asetat, n-butanol, dan air. Hasil dari fraksinasi dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Persentase Rendemen Fraksi

Fraksi	Berat Hasil	Rendemen	Warna	Konsistensi
Kloroform	1,194 gram	5,93%	Hijau tua	Pasta
Etl Asetat	1,857 gram	5,97%	Coklat	Pasta
N-Butanol	4,048 gram	20,24%	Coklat	Kental
Air	11,479 gram	57,40%	Coklat	Kental

5.3 Penapisan Fitokimia Fraksi Buah Jambu Wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc.)

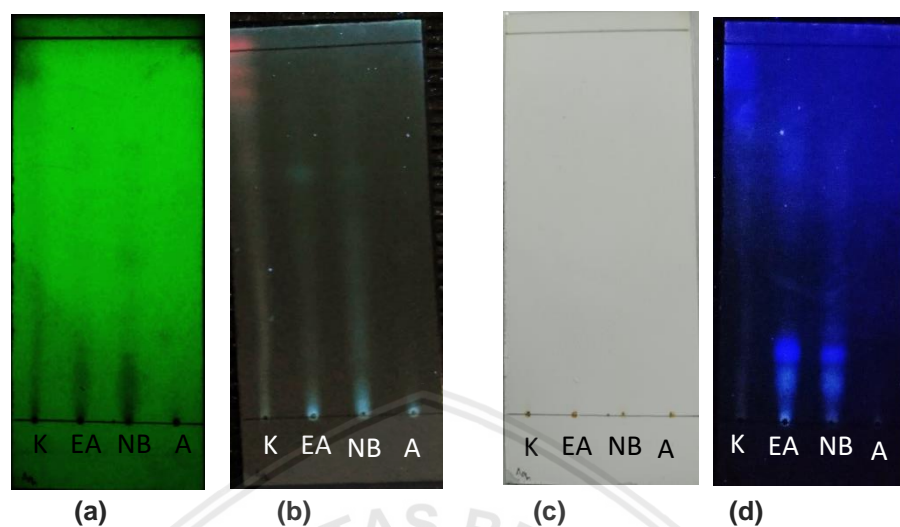
Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder pada fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol, dan air buah

jambu wer (*Prunus persica Zieb & Zucc.*). Hasil penapisan fitokimia secara keseluruhan dapat dilihat pada Tabel 5.3.

5.3.1 Antrakuinon

Identifikasi antrakuinon pada fraksi dilakukan dengan menotolkan sampel uji pada lempeng KLT yang dieluasi dengan fase gerak etil asetat : metanol : air dengan perbandingan 100:13,5:10. Hasil yang didapatkan dilihat di bawah sinar UV 254 nm memperlihatkan adanya satu noda berwarna hitam dengan nilai R_f sebesar 0,92 pada fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan n-butanol menunjukkan noda berwarna hitam yang *tailing*, dan fraksi air tidak menunjukkan adanya noda. Lempeng KLT tersebut juga diamati di bawah sinar UV 365 nm, fraksi kloroform menunjukkan tiga noda berwarna jingga dengan nilai R_f berturut-turut 0,86; 0,92 dan 0,98, fraksi etil asetat menunjukkan satu noda berwarna biru dengan nilai R_f sebesar 0,68, fraksi n-butanol dan air menunjukkan noda berwarna biru yang *tailing*.

Setelah dieluasi, lempeng KLT diberikan penampak noda KOH 10%. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna noda menjadi kuning secara visual dan di bawah sinar UV 366 nm. Hasil identifikasi tidak menunjukkan adanya noda berwarna kuning secara visual dan di bawah sinar UV 366 nm, sehingga dapat disimpulkan bahwa semua sampel fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Zieb & Zucc*) tidak mengandung antrakuinon. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Profil KLT identifikasi antrakuinon. (a) Sebelum disemprot KOH 10% dan diamati di bawah sinar UV 254 nm; (b) Sebelum disemprot KOH 10% dan diamati di bawah sinar UV 366 nm; (c) Setelah disemprot KOH 10% dan diamati pada sinar tampak; (d) Setelah disemprot KOH 10% dan diamati di bawah sinar UV 366 nm.

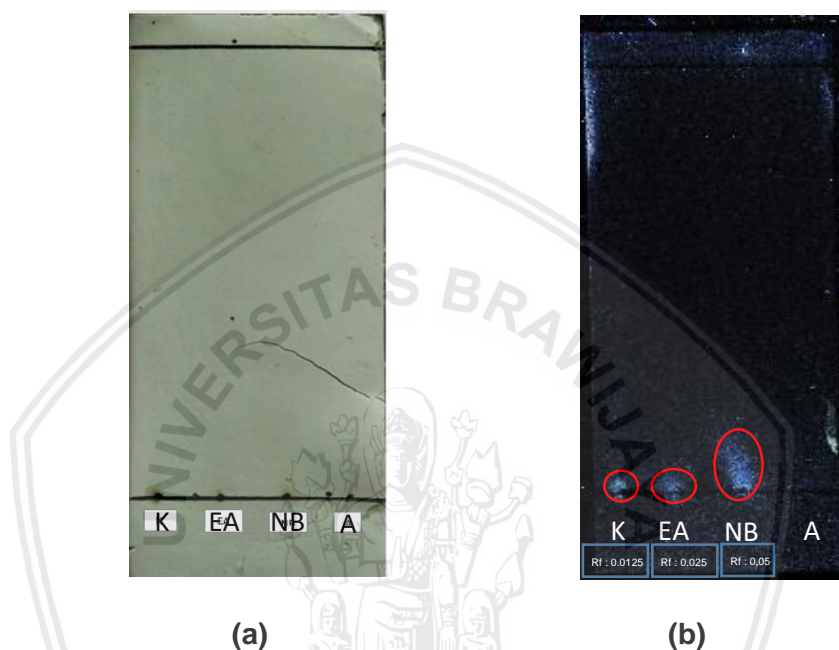
Keterangan. K : Kloroform; EA : Etil Asetat; NB : N-Butanol; A : Air.

5.3.2 Flavonoid

5.3.2.1 Penampak noda H_2SO_4

Identifikasi senyawa flavonoid dieluasi dengan fase gerak n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 1:9. Pengujian KLT ini dilanjutkan dengan penyemprotan menggunakan larutan H_2SO_4 . Hasil positif menunjukkan adanya noda berwarna kuning dengan pengamatan sinar tampak, dan berwarna biru dengan pengamatan pada sinar UV 366 nm. Hasil identifikasi pada sampel uji fraksi setelah diberikan penampak noda H_2SO_4 menunjukkan noda yang *tailling* pada fraksi kloroform, etil asetat dan n-butanol yang diamati pada sinar tampak. Pada pengamatan sinar UV 366 nm terdapat noda berwarna biru yang *tailling* pada fraksi kloroform, etil asetat dan n-butanol dengan nilai r_f masing-masing adalah 0,0125 ; 0,025 ; dan

0,05 yang menandakan adanya senyawa flavonoid. Dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform, etil asetat dan n-butanol buah jambu wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc) mengandung flavonoid. Hasil identifikasi flavonoid dapat dilihat pada Gambar 5.2.



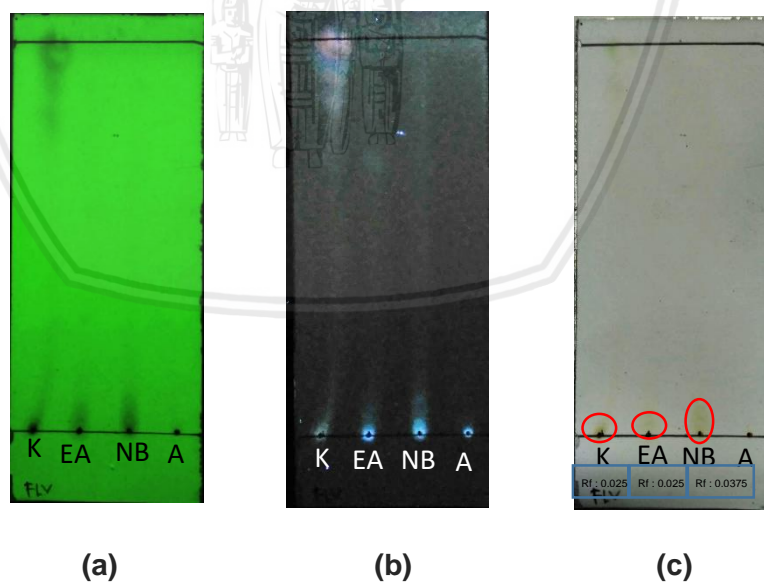
Gambar 5.2 Profil KLT identifikasi flavonoid. (a) Setelah disemprot H_2SO_4 dan diamati pada sinar tampak; (b) Setelah disemprot H_2SO_4 dan diamati di bawah sinar UV 366 nm, terlihat noda berwarna biru.

Keterangan. K : Kloroform; EA : Etil Asetat; NB : N-Butanol; A : Air.

5.3.2.2 Penampak noda amonia

Identifikasi senyawa flavonoid juga dapat dilakukan dengan menggunakan penampak noda amonia. Fase gerak yang digunakan pada pengujian ini adalah etil asetat : aseton dengan perbandingan 2:8. Setelah dieluasi, lempeng KLT diamati di bawah sinar UV 254 nm menunjukkan noda berwarna hitam yang *tailing* pada semua fraksi. Lempeng tersebut juga diamati di bawah sinar UV 366 nm dan juga memperlihatkan noda yang *tailing* pada semua fraksi.

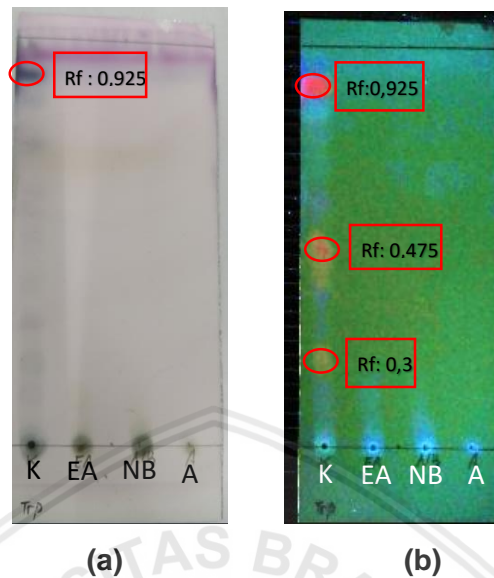
Sampel uji yang mengandung senyawa flavonoid akan memperlihatkan perubahan warna kuning dengan pengamatan sinar tampak setelah diberikan penampak noda uap amonia. Hasil identifikasi menunjukkan adanya noda berwarna kuning yang *tailing* pada fraksi kloroform, etil asetat dan n-butanol yang diamati pada sinar tampak setelah diberi penampak noda uap amonia. Nilai R_f dari sampel fraksi kloroform, etil asetat, dan n-butanol adalah 0,025; 0,025 dan 0,0375. Pada fraksi air tidak menunjukkan adanya noda berwarna kuning setelah diberi uap amonia. Hal tersebut menandakan fraksi air tidak mengandung senyawa flavonoid. Dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol buah jambu wer (*Prunus persica Zieb & Zucc*) mengandung flavonoid. Hasil identifikasi flavonoid dapat dilihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Profil KLT identifikasi flavonoid. (a) Sebelum diberi uap amonia dan diamati di bawah sinar UV 254 nm; (b) Sebelum diberi uap amonia dan diamati di bawah sinar UV 366 nm; (c) Setelah diberi uap amonia dan diamati pada sinar tampak, terlihat noda bewarna kuning. **Keterangan.** K : Kloroform; EA : Etil Asetat; NB : N-Butanol; A : Air.

5.3.3 Terpenoid

Uji terpenoid dilakukan dengan diberikan penampak noda anisaldehyd asam sulfat setelah dieluasi dengan fase gerak n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 1:9. Setelah dieluasi, lempeng KLT dipanaskan pada *hotplate* pada 100°C selama 5 menit. Fraksi kloroform menunjukkan positif mengandung terpenoid ditandai dengan terbentuknya noda berwarna ungu dengan nilai *rf* sebesar 0,925 yang diamati pada sinar tampak. Pada fraksi lainnya tidak menunjukkan adanya noda yang berwarna keunguan. Kemudian dilakukan pengamatan pada sinar UV 366 nm menunjukkan adanya 3 noda berwarna jingga pada fraksi kloroform yang menandakan adanya kandungan senyawa terpenoid dengan nilai *rf* dari terendah ke tertinggi adalah 0,3; 0,475 dan 0,925. Pada fraksi lainnya menunjukkan noda berwarna biru yang bukan termasuk dalam senyawa terpenoid. Dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform buah jambu wer (*Prunus persica Zieb & Zucc*) mengandung terpenoid. Hasil identifikasi terpenoid dapat dilihat pada Gambar 5.4



Gambar 5.4 Profil KLT identifikasi terpenoid. (a) Setelah disemprot anisaldehyd asam sulfat dan diamati pada sinar tampak, terlihat noda berwarna ungu; (b) Setelah disemprot anisaldehyd asam sulfat dan diamati di bawah sinar UV 366 nm, terlihat noda berwarna jingga.

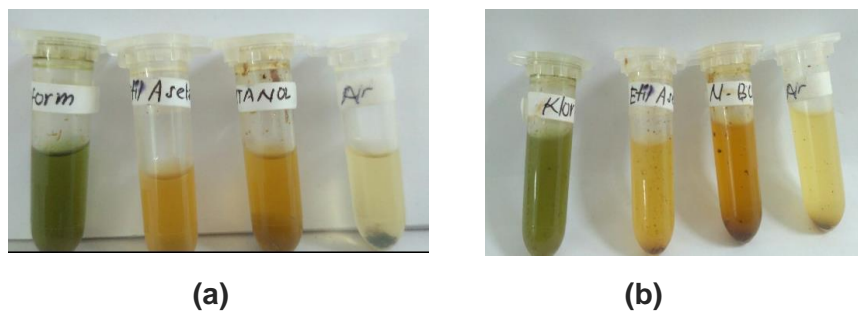
Keterangan. K : Kloroform; EA : Etil Asetat; NB : N-Butanol; A : Air.

5.3.4 Tanin dan Polifenol

5.3.4.1 Perekasi Warna

5.3.4.1.1 Gelatin

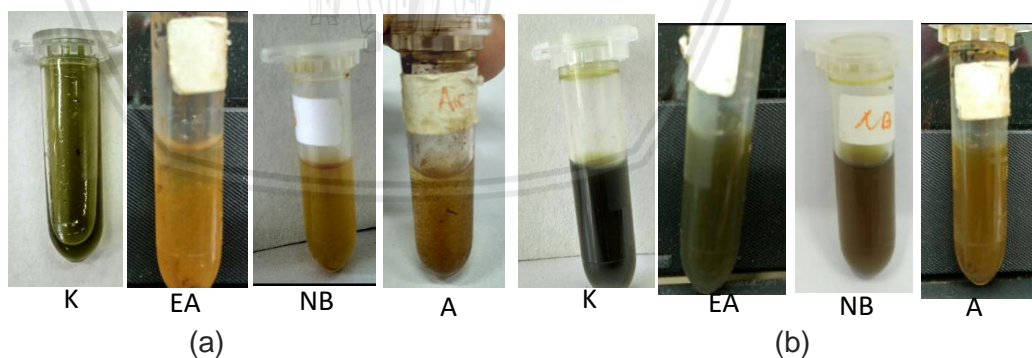
Hasil Identifikasi dapat dilihat pada Gambar 5.5. Pada identifikasi tanin hasil dikatakan positif apabila terdapat endapan putih setelah ditetesi dengan gelatin 10%. Berdasarkan hasil pengujian tidak terdapat endapan putih pada fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol dan air sehingga dapat dinyatakan bahwa semua fraksi buah jambu wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc) tidak mengandung tanin.



Gambar 5.5 Identifikasi tanin. (a) Sebelum diberi gelatin 10%; (b) Setelah diberi 3 tetes gelatin 10%.

5.3.4.1.2 FeCl₃

Hasil Identifikasi dapat dilihat pada Gambar 5.6. Pada identifikasi polifenol dikatakan positif apabila terdapat perubahan warna sampel uji menjadi hijau kehitaman setelah ditetesi dengan FeCl₃. Berdasarkan hasil pengujian terdapat perubahan warna hijau pada fraksi kloroform, etil asetat sehingga dapat dinyatakan bahwa sampel fraksi kloroform dan etil asetat buah jambu wer (*Prunus persica Zieb & Zucc*) positif mengandung polifenol.

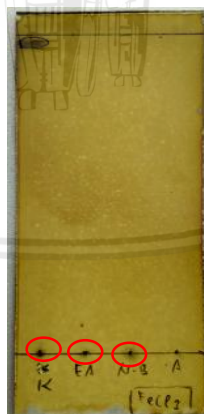


Gambar 5.6 Identifikasi tanin. (a) Sebelum diberi FeCl₃; (b) Setelah diberi 3 tetes FeCl₃.

Keterangan. K : Kloroform; EA : Etil Asetat; NB : N-Butanol; A : Air.

5.3.4.2 Uji KLT

Identifikasi senyawa polifenol dapat dilakukan menggunakan uji KLT dengan diberikan penampak noda FeCl_3 setelah dieluasi dengan fase gerak n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 1:9. Sampel uji dikatakan positif mengandung polifenol apabila terdapat noda berwarna hitam pada lempeng KLT yang sudah dieluasi dan disemprot dengan penampak noda FeCl_3 . Berdasarkan hasil pengujian terdapat noda berwarna hitam pada fraksi kloroform, etil asetat, dan n-butanol yang tidak dapat ditentukan nilai R_f -nya. Fraksi air tidak menunjukkan adanya senyawa polifenol dikarenakan tidak terdapat noda berwarna hitam pada lempeng KLT setelah diberi penampak noda FeCl_3 . Dapat disimpulkan bahwa sampel fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol, dan air buah jambu wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc) mengandung polifenol. Hasil identifikasi polifenol dapat dilihat pada Gambar 5.7



(a)

Gambar 5.7 Profil KLT identifikasi polifenol. (a) Setelah disemprot FeCl_3 dan diamati pada sinar tampak, terlihat noda berwarna hitam.

Keterangan. K : Kloroform; EA : Etil Asetat; NB : N-Butanol; A : Air.

5.3.5 Alkaloid

Identifikasi senyawa alkaloid dilakukan dengan menggunakan penampak noda dragendorf setelah dieluasi dengan fase gerak etil asetat : n-heksana dengan perbandingan 1:9. Hasil uji pada semua fraksi tidak menunjukkan adanya noda berwarna kuning pada lempeng KLT yang sudah dieluasi dan diberi penampak noda. Dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol dan air buah jambu wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc) tidak mengandung alkaloid. Hasil identifikasi alkaloid dapat dilihat pada Gambar 5.8.



Gambar 5.8 Profil KLT identifikasi alkaloid. (a) Setelah disemprot dragendorf dan diamati pada sinar tampak.

Keterangan. K : Kloroform; EA : Etil Asetat; NB : N-Butanol; A : Air.

Tabel 5.3. Tabel Hasil Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Senyawa	Hasil	Kesimpulan			
		K	EA	NB	A
Antrakuinon	Kuning	-	-	-	-
Terpenoid	Ungu	+	-	-	-
		Rf: 0,925			
Flavonoid	H ₂ SO ₄	+	+	+	-
		Rf: 0,0125	Rf: 0,025	Rf: 0,05	
	Amonia	+	+	+	-
		Rf: 0,025	Rf: 0,025	Rf: 0,0375	
Tanin dan Polifenol	Tanin	Endapan putih	-	-	-
	Polifeno I	Hitam	+	+	+
			Rf: -	Rf: -	Rf: -
Alkaloid	Hitam	-	-	-	-

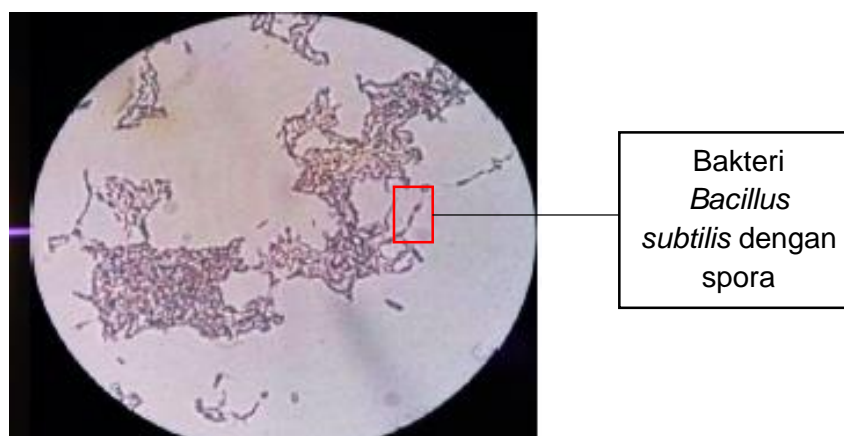
Keterangan. K : Kloroform; EA : Etil Asetat; NB : N-Butanol; A : Air; - : Nilai rf tidak dapat ditentukan.

5.4 Uji Antimikroba

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Bacillus subtilis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum melakukan uji antibakteri, terlebih dahulu dilakukan identifikasi bakteri *Bacillus subtilis* yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Identifikasi bakteri dilakukan melalui 3 tahap, yaitu:

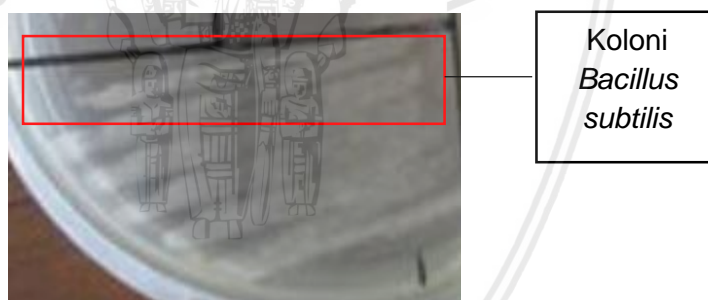
- Pewarnaan Gram
- Kultur pada Medium *Nutrient Agar* (NA)
- Uji Katalase

Tahap pertama adalah pewarnaan Gram. Dari pewarnaan Gram, diperoleh hasil batang Gram positif yang ditandai dengan warna ungu pada bakteri (Gambar 5.9).



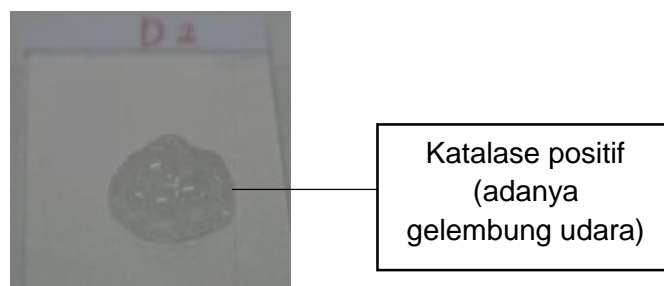
Gambar 5.9. Gambaran Mikroskopik Bakteri *Bacillus subtilis*
Keterangan. Perbesaran 1000x, berbentuk batang, berwarna ungu, Gram positif, ada spora.

Tahap kedua adalah penanaman pada medium *Nutrient Agar* (NA). *Bacillus subtilis* akan memberikan karakteristik koloni khas, yaitu adanya koloni berwarna abu-abu, buram, datar, berbentuk bulat dengan ukuran sedang (Gambar 5.10).



Gambar 5.10. Koloni bakteri *Bacillus subtilis* pada Medium *Nutrient Agar* (NA)
Keterangan. Terlihat koloni berwarna putih dengan batas tidak rata.

Tahap ketiga adalah tes katalase. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya gelembung udara setelah diberi oleh H_2O_2 . Proses ini merupakan hasil dari pemecahan H_2O_2 menjadi H_2 dan O_2 . Bakteri *Bacillus subtilis* menunjukkan adanya gelembung setelah diberi H_2O_2 . Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus subtilis* termasuk bakteri aerob (Gambar 5.11).



Gambar 5.11. Tes Katalase

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antimikroba dari ekstrak etanol 80% dan fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Zieb & Zucc*) terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19569 menggunakan metode mikrodilusi. Metode mikrodilusi digunakan untuk mendapatkan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM), kemudian dilakukan swab pada media *Nutrient Agar* (NA) untuk mendapatkan nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM). Hasil dari uji antimikroba menggunakan metode mikrodilusi dapat dilihat pada Tabel 5.4 dan 5.5.

Tabel 5. 4. Hasil Uji mikrodilusi terhadap bakteri *Bacillus subtilis* (mikroplate)

No	Sampel	Konsentrasi (ppm)									
		50000	25000	12500	6250	3125	1562,5	781,25	390.63	195.31	97.66
1	Seftriakson	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Ekstrak	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	Fraksi Kloroform	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4	Fraksi Etil Asetat	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	Fraksi N-Butanol	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Fraksi Air	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : (+) : menunjukkan adanya aktivitas antimikroba; (-) : menunjukkan adanya aktivitas antimikroba.

Tabel 5.5 Hasil Uji Mikrodilusi terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19569

No	Sampel Uji	Kadar Hambat Minimum	Kadar Bunuh Minimum
1	Seftriakson	97.66 ppm	*
2	Ekstrak	12500 ppm	25000 ppm
3	Fraksi Kloroform	25000 ppm	50000 ppm
4	Fraksi Etil Asetat	12500 ppm	50000 ppm
5	Fraksi N-Butanol	25000 ppm	-
6	Fraksi Air	50000 ppm	-

Keterangan : * : Tidak dilakukan uji Kadar Bunuh Minimum; - : Tidak teramati pada konsentrasi tertinggi (50.000 ppm).





BAB 6

PEMBAHASAN

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi menggunakan pelarut etanol 80%. Prinsip dari maserasi adalah memisahkan suatu komponen dari campurannya menggunakan pelarut tertentu (Soebagio, 2003). Pemilihan pelarut etanol 80% dikarenakan etanol mempunyai titik didih yang rendah, aman, tidak beracun dan tidak berbahaya daripada pelarut lainnya (metanol, dietil eter, kloroform). Pelarut etanol juga merupakan pelarut dengan daya ekstraktif terbesar untuk semua bahan alam berbobot molekul rendah seperti alkaloid, saponin dan flavonoid (Djamal, 2010). Digunakan konsentrasi 80% dikarenakan pada konsentrasi tersebut memiliki nilai rendemen ekstrak yang lebih banyak daripada konsentrasi etanol 70% dan 95% (Senja, dkk., 2014). Setelah proses maserasi, dilakukan remaserasi untuk menarik senyawa metabolik yang lebih optimal dikarenakan adanya penggantian pelarut yang telah jenuh dengan pelarut yang baru (Huliselan, Y.M., dkk., 2015). Hasil maserasi kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C untuk memisahkan hasil ekstrak dengan pelarutnya. Suhu yang digunakan 40°C bertujuan agar tidak merusak senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada filtrat apabila menggunakan suhu yang tinggi (Aditya, dkk., 2016).

Hasil ekstrak yang dihasilkan berwarna coklat dan bertekstur kental dengan rendemen sebesar 27,65%. Persentase hasil rendemen yang didapat dari proses maserasi menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan. Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak (Armando, 2009). Rendemen suatu ekstrak dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah metode ekstraksi yang digunakan (Depkes RI, 2000).

Selain itu, lamanya ekstraksi juga dapat mempengaruhi hasil rendemen yang didapatkan. Semakin lama waktu ekstraksi akan menghasilkan rendemen yang tinggi, karena kesempatan bereaksi antara bahan dengan pelarut semakin lama sehingga proses penetrasi pelarut ke dalam sel bahan semakin baik yang menyebabkan semakin banyak senyawa yang berdifusi ke luar sel (Mardina, P., 2011).

Selanjutnya dilakukan proses fraksinasi. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat menggunakan berbagai pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda menggunakan corong pisah. Tujuan fraksinasi adalah untuk memisahkan komponen-komponen senyawa aktif dari ekstrak yang dihasilkan. Prinsip dari proses fraksinasi adalah didasarkan pada perbedaan tingkat kepolaran dan perbedaan bobot jenis antar dua fraksi (Pratiwi, dkk., 2016). Pelarut yang digunakan adalah kloroform (non polar), etil asetat (semi polar), n-butanol (semi polar), dan air (polar). Perbedaan pelarut dalam proses fraksinasi dapat mempengaruhi kandungan total senyawa metabolit sekunder. Hal ini disebabkan karena perbedaan polaritas dari pelarut (Megha, dkk., 2014; Santoso, dkk., 2002).

Hasil rendemen dari proses fraksinasi kloroform, etil asetat, n-butanol dan air berturut-turut adalah 5,97%, 5,93%, 20,24%, dan 57,40%. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Rahmatika (2019) memiliki hasil rendemen yang sama yaitu fraksi air memiliki nilai rendemen tertinggi sebesar 26,7%. Kemudian fraksi semi polar yaitu etil asetat memiliki nilai rendemen sebesar 8,7 % dan fraksi non polar yaitu kloroform memiliki nilai rendemen terendah sebesar 5,7%. Air memiliki nilai rendemen tertinggi menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung pada ekstrak etanol *Prunus persica Zieb & Zucc* lebih banyak senyawa yang bersifat polar. Pada fraksi kloroform menghasilkan rendemen yang sangat rendah

menunjukkan senyawa non polar yang terkandung dalam ekstrak etanol *Prunus persica* Zieb & Zucc sangat sedikit.

Selanjutnya dilakukan penapisan fitokimia dengan menggunakan metode KLT untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit yang terkandung dalam fraksi buah jambu wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc.). Identifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi *Prunus persica* Zieb & Zucc ditentukan dengan menggunakan penampak noda spesifik pada setiap identifikasi senyawa metabolit dan melihat nilai rf pada noda senyawa tersebut. Identifikasi senyawa yang dilakukan adalah antrakuinon, flavonoid, terpenoid, tanin, polifenol, dan alkaloid.

Hasil identifikasi senyawa flavonoid menggunakan penampak noda H_2SO_4 dan amonia menunjukkan hasil noda yang *tailing*. *Tailing* terjadi disebabkan adanya interaksi antara gugus silanol pada fase diam silika dengan pelarut sehingga menyebabkan puncak yang berekor (Dachriyanus, Meri S., 2017). Selain itu, hasil identifikasi pada senyawa polifenol menunjukkan hasil noda yang tidak naik. Hal tersebut terjadi dikarenakan pelarut yang digunakan untuk eluasi belum bisa menarik senyawa polifenol. Rekomendasi pelarut yang dapat digunakan untuk identifikasi senyawa polifenol adalah pelarut butanol : asam asetat: air (35 :5 :12) lalu disemprot dengan $FeCl_3$ yang menunjukkan adanya senyawa polifenol yang dapat ditentukan nilai rfnya pada biji *Elettaria cardamomum* (Abbas, dan Maliki Matter, 2011). .

Hasil dari identifikasi senyawa metabolit sekunder yaitu didapatkan fraksi kloroform buah jambu wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc.) positif mengandung terpenoid, flavonoid, dan polifenol. Terdapat beberapa penelitian sebelumnya yang mendapatkan hasil yang serupa mengenai kandungan senyawa metabolit

sekunder pada fraksi kloroform. Hasil fraksinasi dengan pelarut kloroform dapat menarik senyawa seperti alkaloid, terpenoid, xantofil, flavonoid, dan terpenoid (Ncube, dik., 2008; Dewi, 2007).

Hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder pada fraksi etil asetat dan n-butanol menunjukkan hasil yang sama, yaitu flavonoid dan polifenol. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Dhingra, N., dkk (2017), menunjukkan bahwa adanya perbedaan total fenolik dan total flavonoid pada tanaman *Prunus dulcis* yang terkandung dalam fraksi etil asetat dan fraksi n-butanol. Nilai total fenolik pada fraksi etil asetat dan n-butanol adalah $73,470 \pm 0,008$ mg GAE/g dan $36,020 \pm 0,004$ mg GAE/g. Nilai total flavonoid pada fraksi etil asetat dan n-butanol adalah $49,400 \pm 0,018$ mg GAE/g dan $38,530 \pm 0,017$ mg GAE/g. Perbedaan tersebut dikarenakan kelarutan dari setiap senyawa tergantung pada pelarut yang digunakan. Tingginya polifenol pada fraksi etil asetat diduga adanya golongan senyawa polifenol yang memiliki berat molekul yang sama dengan pelarut etil asetat seperti tanin dan flavonol (Nur dan Astawan, 2011).

Hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder pada fraksi air tidak menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder apapun. Terdapat beberapa penelitian sebelumnya mengenai kandungan senyawa metabolit sekunder pada fraksi air. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Edrah, dkk (2015), fraksi air daun *Prunus persica* mengandung senyawa metabolit tanin, saponin, phlobatanin, dan flavonoid. Selain itu, fraksi air pada tanaman yang satu genus dengan *Prunus persica* yaitu *Prunus dulcis* memiliki total flavonoid dan polifenol yang kecil diantara fraksi etil asetat dan n-butanol yaitu sebesar $30,400 \pm 0,016$ mg kuersetin/g dan $24,030 \pm 0,016$ mg GAE/g (Dhingra, N., dkk., 2017). Tidak teridentifikasinya

senyawa pada fraksi air dikarenakan jumlah kandungan senyawa metabolit yang sedikit, sehingga tidak menunjukkan adanya noda yang jelas secara visual.

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antimikroba pada ekstrak etanol 80%, fraksi kloroform, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol dan fraksi air buah jambu wer (*Prunus persica* Zieb. & Zucc.) terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Metode yang dilakukan dalam penelitian ini adalah mikrodilusi menggunakan mikroplate 96 well. Metode mikrodilusi dipilih karena dibandingkan dengan metode lainnya tidak membutuhkan sampel uji yang banyak, mengingat hasil salah satu sampel uji yaitu fraksi kloroform hanya 1 gram. Kontrol negatif yang digunakan yaitu DMSO karena dapat melarutkan senyawa polar dan non polar, serta larut dalam berbagai pelarut organik maupun air (Pratiwi, 2008). Selain itu, DMSO tidak menunjukkan adanya zona hambat terhadap bakteri (Hidayah, dkk., 2016). Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik seftriakson dikarenakan memiliki mekanisme hambatan yang sama dengan antibiotik yang sensitif terhadap bakteri *Bacillus subtilis* yaitu penisilin G, ampisilin, metisilin, dan cephatolin (Coonrod, dik., 1971). Selain itu, seftriakson merupakan antibiotik dengan aktivitas luas (*broad-spectrum*) yang aktif terhadap berbagai jenis bakteri, baik jenis bakteri Gram positif maupun Gram negatif (Tjay, 2002). Media yang digunakan untuk melihat adanya hambatan bakteri pada mikrodilusi adalah media *Mueller Hinton Broth* (MHB). Penggunaan media *Mueller Hinton Broth* (MHB) merupakan media yang direkomendasikan untuk menentukan KHM dengan metode mikrodilusi cair oleh *National Committee for Clinical Laboratory* (NCCLS).

Penelitian ini menggunakan *Enzym Linked Immuno Assay* (ELISA) pada panjang gelombang 620 nm. Teknik *ELISA reader* dapat mengukur secara kuantitatif berdasarkan perubahan warna yang disebabkan oleh reaksi enzimatik

dalam mendeteksi adanya suatu protein dalam sampel (Srimulyati, 2015). Penggunaan panjang gelombang 620 nm diketahui tidak memiliki efek bakterisidal terhadap bakteri *Bacillus subtilis* (Astuti, dkk., 2015). Metode *ELISA reader* dilakukan untuk mendapatkan nilai *Optical Density* (OD) yang digunakan sebagai penentuan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM). Selanjutnya dari data OD dilakukan perhitungan persen hambat. Persen hambat yang positif menunjukkan adanya aktivitas penghambatan bakteri pada sampel.

Hasil pengujian nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan menggunakan 10 konsentrasi yang berbeda pada sampel ekstrak etanol 80% dan fraksi buah jambu wer (*Prunus persica Zieb & Zucc.*) yaitu konsentrasi 50000 ppm, 25000 ppm, 12500 ppm, 6250 ppm, 3125 ppm, 1562,5 ppm, 781,25 ppm, 390.63 ppm, 195.31 ppm, dan 97.66 ppm. Hasil uji aktivitas antimikroba pada sampel ekstrak etanol 80% buah jambu wer (*Prunus persica Zieb & Zucc.*) menunjukkan adanya nilai KHM pada konsentrasi 12500 ppm. Selanjutnya hasil nilai KHM pada sampel uji fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol dan air adalah pada konsentrasi 25000 ppm, 12500 ppm, 25000 ppm, dan 50000 ppm. Jika kelima sampel dibandingkan dengan kontrol positif yaitu seftriakson, tidak terdapat satupun sampel yang memiliki nilai KHM yang lebih baik dari seftriakson.

Selanjutnya hasil uji KBM bakteri didapatkan pada fraksi n-butanol dan air buah jambu wer (*Prunus persica Zieb & Zucc.*) tidak mampu membunuh bakteri *Bacillus subtilis* pada konsentrasi maksimal uji yaitu 50000 ppm. Sampel uji ekstrak etanol 80%, fraksi kloroform, dan etil asetat dapat membunuh 100% bakteri *Bacillus subtilis* pada konsentrasi 25000 ppm, 50000 ppm, dan 50000 ppm.

Sampel uji ekstrak memiliki nilai KHM pada konsentrasi 12500 ppm. Nilai KBM pada ekstrak lebih baik daripada fraksi lainnya yaitu pada konsentrasi 25000

ppm. Terdapat penelitian mengenai aktivitas antimikroba yang dilakukan oleh Rani, dkk (2016) dari sampel ekstrak etanol daun *Prunus avium* menunjukkan nilai KHM pada konsentrasi 3000 ppm dan KBM pada konsentrasi 3000 ppm terhadap bakteri *Bacillus subtilis*. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi rendah pada sampel uji ekstrak memiliki efek antimikroba yang baik. Hal tersebut terjadi dikarenakan pada sampel ekstrak menggunakan pelarut etanol yang memiliki memiliki sifat polar dan non polar, sehingga senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak lebih kaya daripada fraksi lainnya. Oleh karena itu, efek aktivitas dari antimikroba pada ekstrak akan lebih optimal daripada fraksi lainnya.

Sampel uji kloroform memiliki nilai KHM pada konsentrasi 25000 ppm dan nilai KBM pada konsentrasi 50000 ppm. Penelitian yang dilakukan oleh Aziz dan Habib (2013) menunjukkan hasil aktivitas antimikroba yang rendah pada sampel uji fraksi kloroform *Prunus persica* terhadap bakteri *Bacillus subtilis* menggunakan metode difusi agar dengan zona hambat sebesar 6 mm. Berdasarkan hasil uji identifikasi senyawa metabolit sekunder, fraksi kloroform memiliki senyawa yang lebih banyak daripada fraksi lainnya. Namun efek antimikrobanya tidak lebih baik daripada fraksi lainnya. Hal tersebut terjadi bisa dikarenakan sifat kepolaran senyawa yang terkandung kurang sesuai dengan dinding bakteri. Bakteri *Bacillus subtilis* merupakan bakteri Gram positif yang memiliki kandungan peptidoglikan yang tinggi dan lipid yang rendah, sehingga bakteri Gram positif lebih bersifat polar (Pratiwi, 2008). Selain itu, bakteri *Bacillus subtilis* memiliki struktur dinding sel berlapis (Brogden, 2005). Fraksi kloroform merupakan pelarut yang bersifat non polar, sehingga senyawa yang terkandung dalam fraksi sulit untuk dapat masuk

ke dalam sel bakteri secara optimal dikarenakan perbedaan kepolaran dan lapisan dinding bakteri yang berlapis.

Sampel uji etil asetat memiliki nilai KHM pada konsentrasi 12500 ppm dan nilai KBM pada konsentrasi 50000 ppm. Sampel uji n-butanol memiliki nilai KHM yang lebih tinggi daripada etil asetat yaitu pada konsentrasi 25000 ppm dan pada konsentrasi tertinggi yaitu 50000 ppm masih menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba. Kandungan senyawa metabolit sekunder keduanya sama yaitu flavonoid dan polifenol, namun efek penghambatan keduanya berbeda. Hal tersebut dikarenakan kandungan antara senyawa metabolit yang terkandung dari etil asetat dan n-butanol memiliki jumlah yang berbeda, sehingga dapat mempengaruhi efek aktivitas antimikroba dari kedua fraksi. Kandungan senyawa metabolit yang sedikit pada fraksi n-butanol menyebabkan efek penghambatan yang lebih buruk daripada fraksi etil asetat. Oleh karena itu, perlu menggunakan konsentrasi yang lebih tinggi pada fraksi n-butanol agar dapat membunuh bakteri *Bacillus subtilis*.

Sampel uji air memiliki nilai KHM pada konsentrasi 50000 ppm. Namun, pada konsentrasi maksimal uji yaitu 50000 ppm masih menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba. Berdasarkan hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder, fraksi air tidak menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder. Namun, pada uji aktivitas antimikroba terdapat adanya hambatan yang rendah daripada fraksi lainnya. Hal tersebut dimungkinkan terjadi karena adanya senyawa metabolit yang terkandung dalam fraksi air dengan jumlah sedikit, sehingga tidak terlihat adanya noda yang spesifik. Kandungan senyawa metabolit yang sedikit tersebut menyebabkan efek penghambatan pada fraksi air rendah. Oleh karena itu, perlu menggunakan konsentrasi tinggi pada fraksi air agar dapat membunuh bakteri *Bacillus subtilis*.

Aktivitas antibakteri pada fraksi kloroform, etil asetat dan fraksi n-butanol disebabkan karena adanya kandungan senyawa metabolit yang terkandung dalam fraksi. Fraksi kloroform mengandung terpenoid, polifenol, dan flavonoid, serta fraksi etil asetat, n-butanol, dan air mengandung polifenol, dan flavonoid. Senyawa terpenoid, polifenol, dan flavonoid memiliki aktivitas antimikroba dengan mekanisme penghambatan yang berbeda. Berdasarkan Cushnie dan Lamb (2005), senyawa flavonoid dapat berikatan dengan peptidoglikan pada dinding sel bakteri sehingga terjadi pengendapan protein yang dapat menghambat proses biosintesis peptidoglikan dan menghambat DNA gyrase. Mekanisme antimikroba terpenoid dengan menghasilkan membran yang mengganggu komponen lipofilik dinding sel bakteri (Cowan, 1999). Senyawa polifenol memiliki aktivitas antibakteri dengan berperan sebagai toksin dalam protoplasma, merusak dan menembus dinding sel serta mengendapkan protein sel bakteri (Heyne, 1987).

Implikasi penelitian ini terhadap bidang kefarmasian adalah didapatnya data metabolit sekunder yang terdapat pada buah jambu wer (*Prunus persica Zieb & Zucc.*) sehingga dapat dilakukan penelitian lebih lanjut terkait potensi aktivitas antibakteri dari masing-masing senyawa tersebut. Selanjutnya didapatkan fraksi etil asetat yang memiliki aktivitas antibakteri paling potensial terhadap bakteri *Bacillus subtilis*. Maka dapat dilakukan penelitian lanjutan terkait metabolit sekunder dan zat aktif pada fraksi etil asetat untuk dilakukan isolasi dan analisis antibakterinya lebih lanjut.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Fraksi kloroform buah jambu wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc.) mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, terpenoid, pelifenol. Fraksi etil asetat, fraksi n-butanol mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid dan polifenol. Fraksi air tidak mengandung satupun senyawa metabolit sekunder.
2. Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol 80% buah jambu wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc.), fraksi kloroform, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air berturut-turut yaitu 12500 ppm, 25000 ppm, 12500 ppm, 25000 ppm, dan 50000 ppm pada bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659. Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol 80% buah jambu wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc.), fraksi kloroform, dan fraksi etil asetat berturut-turut yaitu 25000 ppm, 50000 ppm, dan 50000 ppm. Sampel fraksi n-butanol dan air membutuhkan konsentrasi lebih dari 50000 ppm untuk dapat membunuh bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19659.

7.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang data diberikan untuk kelanjutan dari penelitian ini adalah :

1. Menentukan golongan senyawa dalam fraksi (kloroform, etil asetat dan n-butanol) buah jambu wer (*Prunus persica Zieb & Zucc*) yang berperan pada aktivitas antibakteri menggunakan metode bioautografi.
2. Melakukan pengujian secara *in silico* untuk menemukan senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai obat antimikroba.



Daftar Pustaka

- Adimpong, David.B., Kim L.S., Line T. Birgitte S., Warda S.A., Dennis S.N., Patrick M.F., Derkx, dan Lene J. 2012. Antimicrobial Susceptibility of Bacillus Strains Isolated from Primary Starters for African Traditional Bread Production and Characterization of the Bacitracin Operon and Bacitracin Biosynthesis. *Journal ASMong*. 78(22): 7903-7914.
- Aini, F.N., S. Sukamto, D. Wahyuni, R.G Suhesti, dan Q. Ayyunin. 2013. Penghambatan pertumbuhan Colletotrichum gloeosporioides oleh Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Bacillus subtilis dan Pseudomonas fluorescens. *Jurnal Pelita Perkebunan* 29(1): 44-52.
- Al-Maliki, A.D.M.. 2011. Isolation and Identification of Phenolic Compunds from *Elettaria cardamomum* Seeds and Study of Their Medicinal Activity Againts Pathogenic Bacteria of Prostate Gland. *Journal of Missan Researches*. 8 (15): 13-35.
- Armando, R. 2009. *Memproduksi 15 Minyak Atsiri Berkualitas*. Penerbit Penebar Swadaya. Jakarta.
- Astuti, S.D., Rania B., Moh. Yasin.. 2015. Potensi Pemaparan *Light Diode* (LED) Inframerah Untuk Fotoinnaktivasi Bakteri *Bacillus subtilis*. *Jurnal Biosains Pascasarjana*. 17(1) : 1-10.
- Aziz, Sumaira, dan Habib-ur-Rahman. 2012. Biological activities of Prunus persica L. batch. *Journal of Medical Plants Research*. 7(15). 947-951.
- Barbosa, M.T., dkk. 2005. Applied and Environmental Microbiologi: Screening for Bacillus Isolates in The Broiler Gastrointestinal Tract. Vol 71. No. 2. American Society for Mikrobiologi. Amerika.
- Bari, S. B., Mahajan, B. M., Surana, S. J, 2008, Resistance to antibiotic : A challenge in chemotherapy. *Indian journal of pharmaceutical education and research*. 42(1): 3-11.
- Baron, Samuel. 1996. *Medical Microbiology, 4th edition*. University of Texas Medical Branch. Galveston,Texas.
- Botoro, J., Setiadi, D., Chikmawati, T. & Purwanto, Y. 2011, Pengetahuan tentang Tumbuhan Masyarakat Tengger di Bromo Tengger Semeru, Malang, Jawa Timur. *Jurnal Sosial dan Humaniora*, 14 (1).

- Brogden KA. 2005. Antimicrobial peptida: Pore formers or metabolik inhibitors in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 3: 238-250.
- Budianto, dan Heny S. 2017. Aktivitas Antagonis *Bacillus subtilis* terhadap *Streptococcus iniae* dan *Pseudomonas fluorescens*. *Jurnal Veteriner.* 18(3) : 409-415.
- Carpenter, Darcie E., Keren A., Diane M.C., Joan L.D., Meredith H., Stephen G.J., Cindy K., Laura K. Aundrey N.S., Hannah W., 2018. *Method for Natimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria : ed 9th*. Clinical and Laboratory Standart Institute. Wayne.
- CDC, 2013, *Antibiotik Resistance Threats in the United States, 2013*, US Department of Health and Human Service, Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta.
- Ciesla WP, Guerrant RL. Infectious Diarrhea. In: Wilson WR, Drew WL, Henry NK, et al editors. *Current Diagnosis and Treatment in Infectious Disease*. New York: Lange Medical Books, 2003. 225 - 68.
- Coonrod, J.D., Peter J.L., Theodore C.E. 1971. Antibiotic Susceptibility of *Bacillus* species. *The Journal of Infectious Diseases.* 123(1); 102-105.
- Cowan, M.M.. 1999. Plant Product as Antimicrobial Agents. *Journal Microbiology Reviews.* 12(4): 564-582.
- Cushine, T.P., Lamb, Andrew J.. 2005. *Review Antimicroba Activity of Flavonoids*. Schol of Pharmacy. The Robert Gordon University, Schoolhill, Aberdeen AB10 1FR. UK.
- Dachriyanus, M.S.. 2017. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas. Sumatera Barat.
- Darmadi, dr, 2008, *Infeksi Nosokomial Problematika dan Pengendaliannya*, Salemba Medika, Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Depkes RI. Jakarta.
- Dewi, A.S.. 2007. Uji Aktioksidan Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Air Ekstrak Etanol Teh Hijau Melalui Penangkapan Radikal Hidroksil dengan Metode Deoksiribosa. Tugas Akhir. Tidak Diterbitkan, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Dhingra, N., Kar A., Sharma R., Bhasin S.. 2017. In-Vitro Antioxidative Potential Of Different Fractions From *Prunus dulcis* Seeds Vis a Vis Antiproliferative and Antibacterial Activities of Active Compounds. *South African Journal of Botany.* 108: 184-192.

- Djamal R. 2010. *Kimia Bahan Alam: Prinsip-Prinsip Dasar Isolasi dan Identifikasi*. Baiturrahman. Padang.
- Edrah, S., Fouzy A., Ashok K.. 2013. Preliminary Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of *Pistacia atlantica* and *Prunus persica* Plants of Libyan Origin. *International Journal of Science and Research*. 4 (2): 1552-1555.
- Etebu, Ebimieowei, dan Ibemologi A. 2016. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*. 4 : 90-101.
- Gaylord Chemical Company. 2007. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Health and Safety Information. Buletin GGC. No. 106 (Mei 2009). Halaman 3.
- Gilman, Edward F. dan Dennis G.W. 1994. *Prunus persica* : Peach. Web Diakses tanggal 7 November 2018.
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. ITB Press. Bandung.
- Hargono, D. dkk.,. 1986. Sediaan Galenik. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM). Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Heyne, K.. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid II. Badan Litbang Kehutanan. Jakarta.
- Hidayah, Nikmatul, Aisayh K.H., Ahmad S., Irawati, Dewi M. 2016. Uji Efektifitas Ekstrak *Sargassum muticum* Sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas *Staphylococcus aureus*. *Journal of Creativity Students*. 1(1); 1-9.
- Hidayat, A., Bhagawan, WS., dan Umiyah. 2011. Etnofarmasi Suku Tengger Kecamatan Senduro Kabupaten Lumajang. Presented at Simposium Nasional Kimia Bahan Alam XIX, 11-12 Oktober 2011, Samarinda.
- Huliselan, Y.M., Max R.J.R., Defny S.W.. 2015. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Etil Asetat, dan N-heksana dari Daun Sesewanua (*Clerodendron squamatum Vahl.*). *Pharmacon*, 4 (3): 2302-2493.
- Hussain, Talab, Irshad A.B., S.M Jain, dan Arif W. 2015. Phytochemical Screening of Methanolic Extract of *Prunus Persica*. *International Journal of Scientific Research*. 4(3): 52-53.
- Jones ACC, dan Farthing MJG. 2004. Management of infectious diarrhoea. *Gut* 2004; 53:296-305.
- Khare, C.P., 2007. *Indian Medicinal Plants*. Springer. India.
- Khopkar, S.M., 2002. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. UI Press. Jakarta.

- Kumar, N., dan Anugrah C.. 2017. Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of *Prunus persica* (L.). *International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Science*. 6 (6): 2806-2812.
- Lamatenggo, D.A., Defny S.W., Henry E.I.S.. 2018. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Spons *Theonella swihoeo* pada Mikroba Patogen Manusia. *Pharmacon*, 7 (4): 2302-2493.
- Logan., N.A. 2011. *Bacillus* and Relative in Foodborne Illness. *Journal of Applied Microbiology*. 112(3): 417-429.
- Madigan M. T. & Martinko J. M. (2006). Brock biology of microorganisms. 11th edition. Pearson Prentice Hall Inc. Mahajan
- Mardiastuti, H.W., dkk., 2007, Emerging Resistance Pathogen: situasi terkini di Asia, Eropa, Amerika Serikat, Timur Tengah dan Indonesia, *Majalah Kedokteran Indonesia*. 5: 76.
- Mardina, P.. 2011. Pengaruh Kecepatan Putar Pengaduk dan Waktu Operasi pada Ekstraksi Tannin dari Mahkota Dewa. *Jurnal Kimia*. 5 (2): 125-132.
- Mazza, P., Zani, F., Martelli, P. 1992. Studies on the antibiotic resistance of *Bacillus subtilis* strains used in oral bacteriotherapy. *Journal Boll Chim Farm*. 131(11): 401-408.
- Megha N. M and Sabale A. B. 2014. Antimicrobial, Antioxidant and Haemolytic Potential of Brown Macroalga *Sargassum*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(8): 2091-2104.
- Mims, et al, 2004, *Medical Microbiology 3rd ed*, Mosby, London.
- Mohammadou, Bouba-Adji, Gwenaelle L.B., Carl M.M., Georges B. 2014. on the antibiotic resistance of *Bacillus subtilis* strains used in oral bacteriotherapy. *African Journal of Biotechnology*. 13(35): 3617-3627.
- Munaf, Syamsuir, 1994, *Catatan Kuliah Farmakologi Bagian III*, EGC, Jakarta.
- Ncube, N.S., Afolayan A.J., Okoh A.I.. 2018. Assesment Techniques of Antimicrobial Properties of Natural Compounds of Plant Origin: Current Methods and Future Trends. 7 (12): 1797-1806.
- Nur, A.M., Astawan, M. 2011. *Kapasitas Antioksidan Bawang Dayak (Eleutherine palmifolia) Dalam Bentuk Segar, Simplisia dan Keripik Pada Pelarut Nonpolar, Semipolar dan Polar*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Odugbemi, T. (2008). A textbook of medicinal plants from nigeria. Yoba-Lagos, Nigeria: University of Lagos Press.

- OIE Terrestrial Manual. 2012. Guidline 2.1:Laboratory Methodologies For Bacterial Antimicrobial Susceptibility Testing. http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our-scientific_expertise/docs/pdf/GUIDE_2.1_ANTIMICROBIAL.pdf. Diakses tanggal 23 November 2018.
- Pandey, Amita, dan Shalini T. 2013. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2(5) :115-119.
- Paul, M., S. Borok, A. Fraser, L Vidal, dan L. Leibovici. 2005. Empirical antibiotics against Gram-positive infections for febrile neutropenia: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.
- Pratiwi, S.T.. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T., dan Bennet, B.C. 2008. Effect of Extract from Italian Medicinal Plant on Planktonic Growth, Biofilm Formation and Adherence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal Ethnopharmacol*. 118 (3) : 418-428.
- Rahmatika, F.S.. 2019. *Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Fraksi Buah Jambu Wer (Prunus persica (L.) Batch) Terhadap Sel T47D Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Rani, S., Parveen P., Zeba J., Vivek S., Sneh G.. 2016. Antimicrobial Property of Peach Leaves. *International Journal of Home Science*. 2(3): 410-412.
- Raturi, Rakesh., Singh, Harpreet., Bahuguna, P., Sati, SC., Badoni, PP., 2011, *Antibacterial andAntioxidant Activity of Methanolic Extract of Bark of Prunus persica*, *Journal of Applied and Natural Science*, Vol. 3 (2) : 312-314.
- Romadanu, R., Siti H., Lestari, Shanty D.. 2014. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Journal Fishtech*. 3(1): 133-144.
- Santoso, J., Anwariyah, S., Rumiantin, R. O., Putri, A. P., Ukhty, N., & Yoshie-Stark, Y. 2012. Phenol content, antioxidant activity and fibers profile of four tropical seagrasses from Indonesia. *Journal of Coastal Development*. 15 (2): 189-196.
- Senja, Rima Yulia, Elisa I.,Akhmad K.N., Erna P.S.. 2014. Perbandingan Metode Ekstraksi dan Variasi Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kubis Ungu (*Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra*). *Traditional Medicine Journal*. 19 (1): 43-48.
- Shehadi, M., Fatima A., Rana O., Ali C., Kassem H., Hussein A.H., Ali H., Ahmad K.. 2014. Comparative Analysis of The Anti-bacterial Activity of Four Plant Extracts. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 2(6): 83-94.

- Soebagio, B., Rusdiana, T., & Kairudin. (2007). Pembuatan gel dengan aqupec HV-505 dari ekstrak umbi bawang merah (*Allium cepa*, L.) sebagai antioksidan. Prosiding Seminar Penelitian Dosen Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran (12p). Bandung, Indonesia: Unpad.
- Soebagio. 2003. *Kimia Analitik II*. UM Press. Malang.
- Soesanto, L. 2008. Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman, Suplemen ke Gulma dan Nematoda. Rajawali Pers.
- Solichah, W.A.. 2017. Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Ethanolic Extract and Ethyl Acetate Fraction From Basil Leaf (*Ocimum basilicum* L.) by DPPH Scavenging Method. *IOP Publishing*, hal. 1-11.
- Suparno, O., Amalia A., Tania P., Marimin, Rini P.. 2017. The Potency Of Extract as Antimicrobial for The Skin or Hide Preservation. AIP Publishing. 1823, 020098: 1-6.
- Tiim Mikrobiologi FKUB. 2003. Bakteriologi Medik. Bayumedia Publishing. Malang.
- Tjay, T.H., dan Raharja K.. 2002. *Obat-Obat Penting*. Gramedia. Jakarta.
- Ueda, Shigeko, dan Yoshihiro K. 1999. Comparison of *Bacillus subtilis* Strains krom a Food Poisoning Outbreak and Other Sources Analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Biocontrol Science*. 4(1); 51-54.
- Voigt. 1984. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi. Edisi ke-5. Noerono, S. Penerjemah. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta..
- Wannarat, W., Motoyama, S., Masuda, K., Kawamura, F., & Inaoka, T. (2014). Tetracycline tolerance mediated by gene amplification in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (United Kingdom)*, 160(2014), 2474–2480.
- Weber, Lais D., Fabiaba .D.S.P., Mayara C.S., Juliete G.D.L.D.S., Willian D.C., dan Camilia W.L. 2014. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. *African Journal of Agricultural Research*. 9(9): 846- 853.
- WHO SEARO, 2010, Regional Strategy on Prevention and Containment of Antimicrobial Resistance 2010-2015, WHO South East Asian Regional Office, New Delhi.
- World Health Organization (WHO). 2013. Diarrhoeal disease. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>. Diakses tanggal 1 Desember 2018.
- Zein, Umar., Khalid H.S., dan Josia G. 2004. Diare Akut Disebabkan Bakteri. e-USU Repository. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Sumatera Utara.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Proses Ekstraksi

Perhitungan jumlah pelarut yang dibutuhkan untuk proses maserasi

Berat simplisia serbuk *Prunus persica* Zieb & Zucc. x 10 = Jumlah etanol 80%

$$151,08 \times 10 = \text{Jumlah etanol 80\%}$$

$$1510,08 \text{ mL} = \text{Jumlah etanol 80\%}$$

Pembuatan pelarut etanol 80%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$96\% \times V_1 = 80\% \times 1510,8 \text{ mL}$$

$$96\% \times V_1 = 129928,8 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1353,425 \text{ mL}$$

Lampiran 2. Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol 80% Buah Jambu Wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc)

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\% = \frac{56,88}{151,08} \times 100\% = 37,65 \%$$

Ekstrak	Berat Simplisia Serbuk	Pelarut	Jumlah X Maserasi	Berat Hasil Ekstraksi	Rendemen	Warna
Jambu wer	151,08 gram	Etanol 80%	3 kali	56,88 gram	37,65 %	Coklat

Lampiran 3. Perhitungan Rendemen Fraksi Buah Jambu Wer (*Prunus persica* Zieb & Zucc)

$$\% \text{ Rendemen Fraksi Kloroform} = \frac{\text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\% = \frac{1,194}{20} \times 100\% = 5,97 \%$$

$$\% \text{ Rendemen Fraksi Etil Asetat} = \frac{\text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\% = \frac{1,857}{20} \times 100\% = 9,29 \%$$

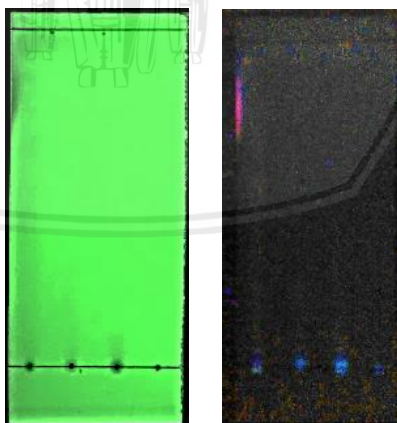
$$\% \text{ Rendemen Fraksi N-butanol} = \frac{\text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\% = \frac{4,048}{20} \times 100\% = 20,24 \%$$

Jenis Fraksi	Jumlah Fraksinasi	X Berat Fraksi	Rendemen
Kloroform	4 kali	1,194	5,97 %
Etil Asetat	6 kali	1,857	9,29 %
N-butanol	6 kali	4,048	20,24 %

Lampiran 4. Optimasi Pelarut Fase Gerak

Lampiran 4.1. Kloroform : Aseton : Asam Formiat (2 : 7,5 : 0,5)

Optimasi fase gerak yang pertama dilakukan dengan menotolkan sampel uji pada lempeng KLT yang dieluasi dengan fase gerak kloroform : aseton : asam format dengan perbandingan 2 : 7 : 0,5. Hasil yang didapatkan dilihat di bawah sinar UV 254 nm memperlihatkan adanya noda berwarna hitam pada fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan n-butanol yang *tailing*, dan fraksi air tidak menunjukkan adanya noda. Lempeng KLT tersebut juga diamati di bawah sinar UV 365 nm, fraksi kloroform, etil asetat, n-butanol dan air menunjukkan adanya noda berwarna biru yang tidak naik.



(a)

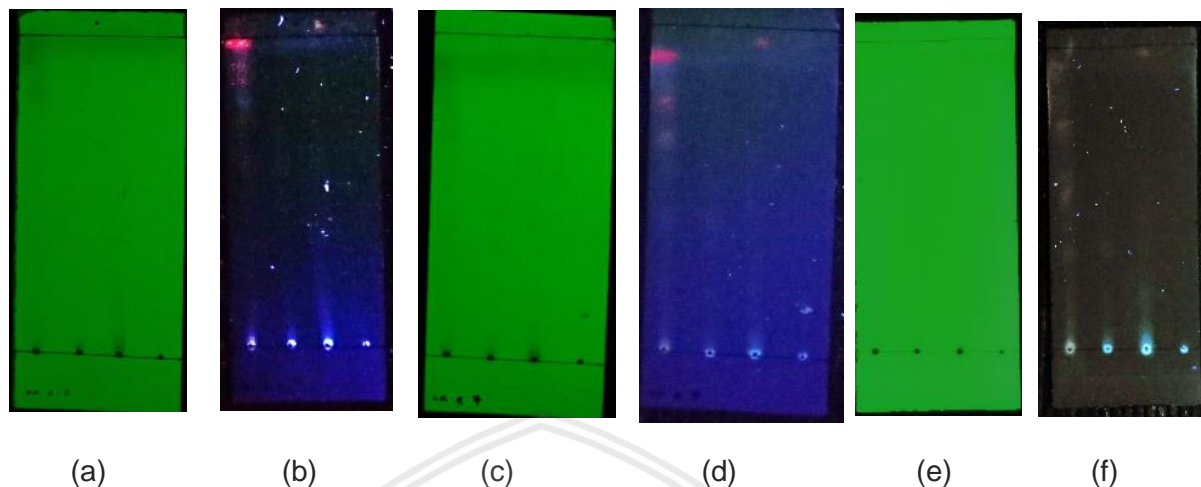
(b)

Gambar 1. Profil KLT fase gerak kloroform : aseton : asam formiat (2 : 7,5 : 0,5). (a) diamati di bawah sinar UV 254 nm; (b) diamati di bawah sinar UV 366 nm.

Lampiran 4.2. Kloroform : Aseton

Optimasi fase gerak yang kedua dilakukan dengan menotolkan sampel uji pada lempeng KLT yang dieluasi dengan 3 macam fase gerak kloroform : aseton dengan perbandingan pelarut yang berbeda-beda. Perbandingan yang digunakan adalah 2:8; 3:7; dan 4:6 . Hasil yang didapatkan dilihat di bawah sinar UV 254 nm pada perbandingan (2:8) dan (3:7) memperlihatkan adanya noda berwarna hitam pada fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan n-butanol yang *tailing*, dan fraksi air tidak menunjukkan adanya noda. Pengamatan di bawah sinar UV 254 nm dengan perbandingan pelarut (4:6) tidak menunjukkan noda pada semua fraksi.

Pengamatan di bawah sinar UV 366 setelah dieluasi pada fase gerak dengan perbandingan (2:8) dan (3:7) menunjukkan adanya 3 noda berwarna merah. Jika dilihat dari persebaran noda yang dihasilkan perbandingan pelarut (3:7) lebih dipilih sebagai fase gerak yang akan digunakan untuk identifikasi senyawa metabolit karena jarak antar noda yang dihasilkan tidak berdekatan seperti pada perbandingan (2:8). Pada perbandingan (4:6) menunjukkan noda biru yang *tailling* pada fraksi kloroform, etil asetat, dan n-butanol, fraksi air menunjukkan noda berwarna biru yang tidak naik.



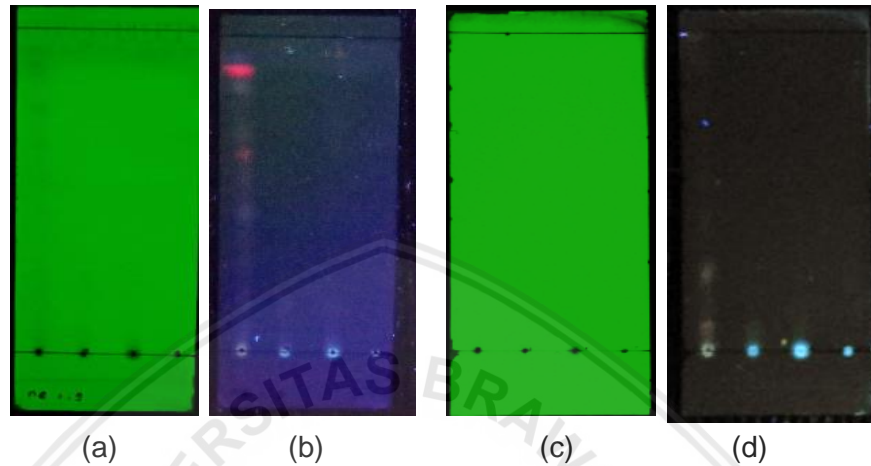
Gambar 2. Profil KLT fase gerak kloroform : aseton. (a) Setelah dieluasi pada fase gerak kloroform: aseton (2:8) dan diamati di bawah sinar UV 254 nm; (b) Setelah dieluasi pada fase gerak kloroform: aseton (2:8) dan diamati di bawah sinar UV 366 nm; (c) Setelah dieluasi pada fase gerak kloroform: aseton (3:7) dan diamati di bawah sinar UV 254 nm; (d) Setelah dieluasi pada fase gerak kloroform: aseton (3:7) dan diamati di bawah sinar UV 366 nm; (e) Setelah dieluasi pada fase gerak kloroform: aseton (4:6) dan diamati di bawah sinar UV 254 nm; (f) Setelah dieluasi pada fase gerak kloroform: aseton (4:6) dan diamati di bawah sinar UV 366 nm.

Lampiran 4.3. N-heksana : Etil Asetat

Optimasi fase gerak yang ketiga dilakukan dengan menotolkan sampel uji pada lempeng KLT yang dieluasi dengan 2 macam fase gerak n-heksana : etil asetat dengan perbandingan pelarut yang berbeda-beda. Perbandingan yang digunakan adalah 1:9; dan 3:7. Hasil yang didapatkan dilihat di bawah sinar UV 254 nm pada perbandingan (1:9) menunjukkan adanya noda berwarna hitam pada fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan n-butanol yang *tailing*, dan fraksi air tidak menunjukkan adanya noda. Pengamatan di bawah sinar UV 254 nm dengan perbandingan pelarut (3:7) tidak menunjukkan adanya noda pada semua fraksi.

Pengamatan di bawah sinar UV 366 setelah dieluasi pada fase gerak dengan perbandingan (1:9) menunjukkan adanya 3 noda berwarna merah dengan nilai R_f

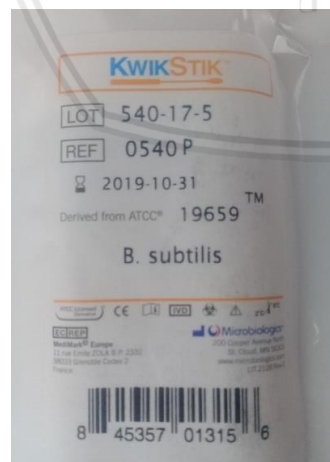
masing-masing adalah 0,907; 0,628; dan 0,465. Pada perbandingan (3:7) menunjukkan noda biru yang tidak naik pada semua fraksi.



Gambar 3. Profil KLT fase gerak N-heksana: etil asetat. (a) Setelah dieluasi pada fase gerak n-heksana: etil asetat (1:9) dan diamati di bawah sinar UV 254 nm; (b) Setelah dieluasi pada fase gerak n-heksana: etil asetat (1:9) dan diamati di bawah sinar UV 366 nm; (c) Setelah dieluasi pada fase gerak n-heksana: etil asetat (3:7) dan diamati di bawah sinar UV 254 nm; (d) Setelah dieluasi pada fase gerak n-heksana: etil asetat (3:7) dan diamati di bawah sinar UV 366 nm.

Lampiran 5. Bakteri *Bacillus subtilis*



Lampiran 5.1 Sampel bakteri *Bacillus subtilis*



Lampiran 5.2 Certificate of Analysis (COA)



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Bacillus subtilis</i> Catalog Number: 0540 Lot Number: 540-17** Reference Number: ATCC® 19659™* Purity: Pure Passage from Reference: 3		Expiration Date: 2019/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Mary L. Bowman Release Date: 2017/12/15	
Macroscopic Features: Large, circular, erosive edge, gray and beta hemolytic as culture ages. Two slightly different colony types may be seen; one is larger with the entire surface being rough and the other is smaller with a smooth center and the periphery being rough.		Performance Medium: SBAP	
Microscopic Features: Slender gram positive bacillus.		Method: Gram Stain (1)	
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.		Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive	
		 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE	
<p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitabel: Although the Vitabel panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>☛ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p>			
 ACCREDITED REFERENCE MATERIAL PRODUCTION CERT #2555.R2		(*) The ATCC Upgraded Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.	
 ATCC Licensed Derivative		(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.	
 ACCREDITED TESTING CERT #2655.01			

Lampiran 6. Perhitungan pengenceran bakteri

Nilai absorbansi terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 19569 pada panjang gelombang 620 nm adalah 0,683.

Konsentrasi bakteri $10^8 = \frac{1}{0,683} = 1,46$ (diambil 1,46 mikro ke dalam 10 mL media cair)

Konsentrasi bakteri $10^7 = M_1 \cdot V = M_2 \cdot V$

$$10^8 \cdot V = 10^7 \cdot 10 \text{ ml} = V = 1 \text{ mL (diambil 1 mikro ke dalam 10 mL media cair)}$$

Konsentrasi bakteri $10^6 = M_1 \cdot V = M_2 \cdot V$

$$10^7 \cdot V = 10^6 \cdot 10 \text{ ml} = V = 1 \text{ mL (diambil 1 mikro ke dalam 10 mL media cair)}$$

Lampiran 7. Perhitungan konsentrasi sampel mikrodilusi

Well 1 = $(10^5 \text{ ppm}) (50 \text{ } \mu\text{L}) = M \cdot 100 \text{ } \mu\text{L}$

$$\begin{aligned} 5 \times 10^6 &= M \cdot 10^2 \\ M &= 5 \times 10^4 = 50.000 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Well 2 = $(5 \times 10^4 \text{ ppm}) (50 \text{ } \mu\text{L}) = M \cdot 100 \text{ } \mu\text{L}$

$$\begin{aligned} 25 \times 10^5 &= M \cdot 10^2 \\ M &= 25 \times 10^3 = 25.000 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Well 3 = $(25 \times 10^3 \text{ ppm}) (50 \text{ } \mu\text{L}) = M \cdot 100 \text{ } \mu\text{L}$

$$\begin{aligned} 125 \times 10^4 &= M \cdot 10^2 \\ M &= 12.500 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Well 4 = $(12.500 \text{ ppm}) (50 \text{ } \mu\text{L}) = M \cdot 100 \text{ } \mu\text{L}$

$$\begin{aligned} 625 \times 10^3 &= M \cdot 10^2 \\ M &= 6.250 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Well 5 = $(6250 \text{ ppm}) (50 \text{ } \mu\text{L}) = M \cdot 100 \text{ } \mu\text{L}$

$$3125 \times 10^2 = M \cdot 10^2$$

$$M = 3125 \text{ ppm}$$

$$\text{Well 6} = (3125 \text{ ppm}) (50 \text{ L}) = M \cdot 100 \text{ L}$$

$$156250 = M \cdot 10^2$$

$$M = 1562,5 \text{ ppm}$$

$$\text{Well 7} = (1562,5 \text{ ppm}) (50 \text{ L}) = M \cdot 100 \text{ L}$$

$$78125 = M \cdot 10^2$$

$$M = 781,25 \text{ ppm}$$

$$\text{Well 8} = (781,25 \text{ ppm}) (50 \text{ L}) = M \cdot 100 \text{ L}$$

$$39062,5 = M \cdot 10^2$$

$$M = 390,63 \text{ ppm}$$

$$\text{Well 9} = (390,63 \text{ ppm}) (50 \text{ L}) = M \cdot 100 \text{ L}$$

$$19531,5 = M \cdot 10^2$$

$$M = 195,31 \text{ ppm}$$

$$\text{Well 10} = (195,31 \text{ ppm}) (50 \text{ L}) = M \cdot 100 \text{ L}$$

$$9765,5 = M \cdot 10^2$$

$$M = 97,66 \text{ ppm}$$

Lampiran 8. Tabel Mikrodilusi pada Mikroplate

Tabel L8.1 Mikrodilusi MHB + Sampel Uji + Suspensi Bakteri

50 µL MHB + 50 µL samp el + 50 µL bakte ri	50 µL MHB + 50 µL well 1 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 2 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 3 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 4 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 5 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 6 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 7 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 8 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 9 + 50 µL bakt eri	50 µL Larut an DMS O 10%	50 µL DMS O + 50 µL bakt eri
50 µL MHB + 50 µL samp el + 50 µL bakte ri	50 µL MHB + 50 µL well 1 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 2 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 3 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 4 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 5 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 6 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 7 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 8 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 9 + 50 µL bakt eri	50 µL Larut an DMS O 10%	50 µL DMS O + 50 µL bakt eri
50 µL MHB + 50 µL samp el + 50 µL bakte ri	50 µL MHB + 50 µL well 1 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 2 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 3 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 4 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 5 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 6 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 7 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 8 + 50 µL bakt eri	50 µL MHB + 50 µL well 9 + 50 µL bakt eri	50 µL Larut an DMS O 10%	50 µL DMS O + 50 µL bakt eri

Tabel L8.2 Mikrodilusi MHB + Sampel Uji + MHB

50 μ L MHB + 50 μ L sampel + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 1 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 2 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 3 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 4 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 5 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 6 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 7 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 8 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 9 + 50 μ L MHB
50 μ L MHB + 50 μ L sampel + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 1 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 2 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 3 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 4 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 5 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 6 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 7 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 8 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 9 + 50 μ L MHB
50 μ L MHB + 50 μ L sampel + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 1 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 2 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 3 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 4 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 5 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 6 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 7 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 8 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 9 + 50 μ L MHB

Tabel L8.3 Mikrodilusi MHB + Seftriakson + Suspensi Bakteri

50 μ L MHB + 50 μ L seftriakson + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 1 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 2 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 3 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 4 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 5 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 6 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 7 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 8 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 9 + 50 μ L bakteri
50 μ L MHB + 50 μ L seftriakson + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 1 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 2 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 3 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 4 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 5 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 6 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 7 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 8 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 9 + 50 μ L bakteri
50 μ L MHB + 50 μ L seftriakson + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 1 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 2 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 3 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 4 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 5 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 6 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 7 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 8 + 50 μ L bakteri	50 μ L MHB + 50 μ L well 9 + 50 μ L bakteri

Tabel L8.4 Mikrodilusi MHB + Seftriakson + MHB

50 μ L MHB + 50 μ L seftriakso n + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 1 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 2 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 3 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 4 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 5 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 6 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 7 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 8 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 9 + 50 μ L MHB
50 μ L MHB + 50 μ L seftriakso n + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 1 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 2 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 3 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 4 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 5 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 6 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 7 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 8 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 9 + 50 μ L MHB
50 μ L MHB + 50 μ L seftriakso n + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 1 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 2 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 3 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 4 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 5 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 6 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 7 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 8 + 50 μ L MHB	50 μ L MHB + 50 μ L well 9 + 50 μ L MHB

Lampiran 9. Perhitungan Persen Hambat

Lampiran 9.1 Sampel Uji Kontrol Positif Seftriakson

No	Konsentrasi	OD	Rata-rata	Standar Deviasi	RSD (%)	%hambatan
1	50.000 ppm	0.067	0.075	0.001	1.3422	99.1663
		0.082				
2	25.000 ppm	0.069	0.072	0.003	3.4965	98.2134
		0.074				
3	12.500 ppm	0.062	0.056	0.006	10.7149	98.5707
		0.05				
4	6.250 ppm	0.053	0.060	0.007	11.6667	99.0472
		0.067				
5	3.125 ppm	0.052	0.055	0.003	5.4545	98.8090
		0.058				
6	1.562,5 ppm	0.063	0.060	0.003	5	96.6651
		0.057				
7	781,3 ppm	0.058	0.063	0.005	7.2	97.0224
		0.067				
8	390,6 ppm	0.058	0.058	0.001	0.8695	98.6899
		0.057				
9	195,3 ppm	0.055	0.056	0.001	0.9009	98.2134
		0.056				
10	97,7 ppm	0.049	0.056	0.000	0	97.3797
		0.063				

Lampiran 9.2 Sampel Uji Ekstrak Etanol 80%

No	Konsentrasi	OD	Rata-rata	Standar Deviasi	RSD (%)	%hambatan
1	50000 ppm	0.836	0.6855	0.151	21.9547	129.657
		0.535				
2	25000 ppm	0.381	0.393	0.012	2.9299	134.183
		0.404				
3	12.500 ppm	0.215	0.213	0.002	0.9389	102.859
		0.211				
4	6.250 ppm	0.721	0.7195	0.002	0.2084	-35.660
		0.718				
5	3.125 ppm	0.734	0.7385	0.005	0.6093	-56.146
		0.743				
6	1.562,5 ppm	0.998	0.9495	0.049	5.1079	-106.170
		0.901				
7	781,3 ppm	0.885	0.843	0.042	4.9822	-85.326
		0.801				
8	390,6 ppm	0.834	0.8475	0.014	1.5929	-88.304
		0.861				
9	195,3 ppm	0.756	0.744	0.012	1.6129	-64.840
		0.732				
10	97,7 ppm	0.882	0.957	0.075	7.7888	-116.889
		1.031				

Lampiran 9.3 Sampel Uji Fraksi Kloroform

No	Konsentrasi	OD	Rata-rata	Standar Deviasi	RSD (%)	%hambatan
1	50.000 ppm	1.728	1.732	0.004	0.2309	78.7994
		1.736				
2	25.000 ppm	1.336	1.565	0.229	14.6325	83.3253
		1.794				
3	12500 ppm	1.024	1.161	0.137	11.8001	-13.3873
		1.298				
4	6.250 ppm	0.494	0.451	0.044	9.6559	80.8242
		0.407				
5	3.125 ppm	1.114	0.924	0.191	20.6280	-80.2048
		0.733				
6	1.562,5 ppm	0.69	0.714	0.024	3.2936	-47.8084
		0.737				
7	781,3 ppm	0.802	0.762	0.041	5.3184	-61.6245
		0.721				
8	390,6 ppm	0.463	0.628	0.160	25.4183	-32.0867
		0.473				
9	195,3 ppm	0.626	0.717	0.090	12.6308	-52.3344
		0.807				
10	97,7 ppm	0.987	0.961	0.027	2.7589	-108.5516
		0.934				

Lampiran 9.4 Sampel Uji Fraksi Etil Asetat

No	Konsentrasi	OD	Rata-rata	Standar Deviasi	RSD (%)	%hambatan
1	50.000 ppm	0.245	0.241	0.005	1.8711	134.1829
		0.236				
2	25.000 ppm	0.266	0.328	0.062	18.7786	125.1310
		0.216				
3	12.500 ppm	0.597	0.567	0.031	5.3839	22.9395
		0.536				
4	6.250 ppm	0.634	0.608	0.027	4.3621	-13.9828
		0.581				
5	3.125 ppm	0.607	0.656	0.049	7.3989	-36.6127
		0.704				
6	1.562,5 ppm	0.707	0.686	0.022	3.1364	-48.9995
		0.664				
7	781,3 ppm	0.672	0.752	0.079	10.5788	-64.7213
		0.653				
8	390,6 ppm	0.704	0.691	0.013	1.8813	-51.9771
		0.678				
9	195,3 ppm	0.562	0.545	0.017	3.1193	-18.3897
		0.528				
10	97,7 ppm	0.699	0.735	0.036	4.8332	-64.0067
		0.77				

Lampiran 9.5 Sampel Uji Fraksi N-butanol

No	Konsentrasi	OD	Rata-rata	Standar Deviasi	RSD (%)	%hambatan
1	50.000 ppm	0.161	0.167	0.006	3.5928	78.7994
		0.173				
2	25.000 ppm	0.482	0.509	0.027	5.2114	9.8380
		0.535				
3	12.500 ppm	0.598	0.661	0.063	9.5310	-44.3545
		0.724				
4	6.250 ppm	0.441	0.607	0.026	4.2833	-33.1586
		0.493				
5	3.125 ppm	0.583	0.567	0.017	2.9126	-23.5112
		0.55				
6	1.562,5 ppm	0.93	1.009	0.079	7.8295	-129.1567
		1.088				
7	781,3 ppm	1.017	0.958	0.059	6.1586	-117.7227
		0.899				
8	390,6 ppm	0.919	0.919	0.001	0.0544	-108.5517
		0.918				
9	195,3 ppm	0.798	0.847	0.049	5.7294	-91.4007
		0.895				
10	97,7 ppm	1.054	1.016	0.039	3.7912	-130.2287
		0.977				

Lampiran 9.6 Sampel Uji Fraksi Air

No	Konsentrasi	OD	Rata-rata	Standar Deviasi	RSD (%)	%hambatan
1	50.000 ppm	0.565	0.588	0.023	3.9115	96.1887
		0.611				
2	25.000 ppm	0.893	0.842	0.051	6.0570	-21.2482
		0.791				
3	12.500 ppm	0.934	0.997	0.063	6.3189	-95.5693
		1.06				
4	6.250 ppm	0.949	0.898	0.052	5.7381	-83.5398
		0.846				
5	3.125 ppm	0.882	0.883	0.001	0.1132	-89.8523
		0.884				
6	1.562,5 ppm	0.674	0.622	0.053	8.4473	-30.8957
		0.569				
7	781,3 ppm	1.041	1.020	0.021	2.0588	-129.3949
		0.999				
8	390,6 ppm	0.747	0.786	0.039	4.9013	-74.0114
		0.824				
9	195,3 ppm	0.781	0.767	0.014	1.8252	-71.7485
		0.753				
10	97,7 ppm	0.548	0.660	0.112	16.9697	-45.7837
		0.772				

Lampiran 10. Perhitungan

Contoh Perhitungan %RSD Sampel Ekstrakl Kosentrasi 50000 ppm

$$\begin{aligned} \%RSD &= \frac{SD}{Rata-rata} \times 100\% \\ &= \frac{0,151}{0,6855} \times 100\% = 21,95 \% \end{aligned}$$

Contoh Perhitungan Persen Hambat Sampel Ekstrak Kosentrasi 50000 ppm

$$\text{Rumus Persen Hambatan} = \left\{ 1 - \frac{OD \text{ Kontrol Negatif} - OD \text{ Sampel Uji}}{OD \text{ Kontrol Negatif}} \right\} \times 100\%$$

Keterangan :

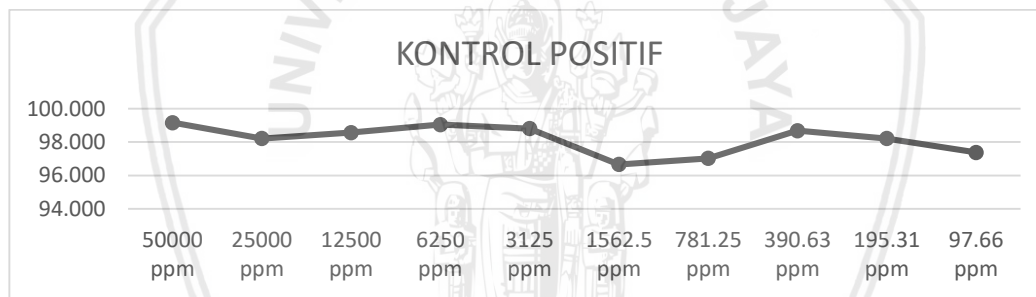
$$\begin{aligned} \text{OD Sampel Uji} &= \text{Rerata (Suspensi bakteri } 50 \mu\text{L + MHB } 50 \mu\text{L + Sampel Uji } 50 \mu\text{L)} - \text{Rerata (MHB } 50 \mu\text{L + Sampel Uji } 50 \mu\text{L + MHB } 50 \mu\text{L)}. \\ &= 0,6855 - 0,810 \\ &= -0,1245 \end{aligned}$$

$$\text{OD Kontrol negatif} = 0,4198$$

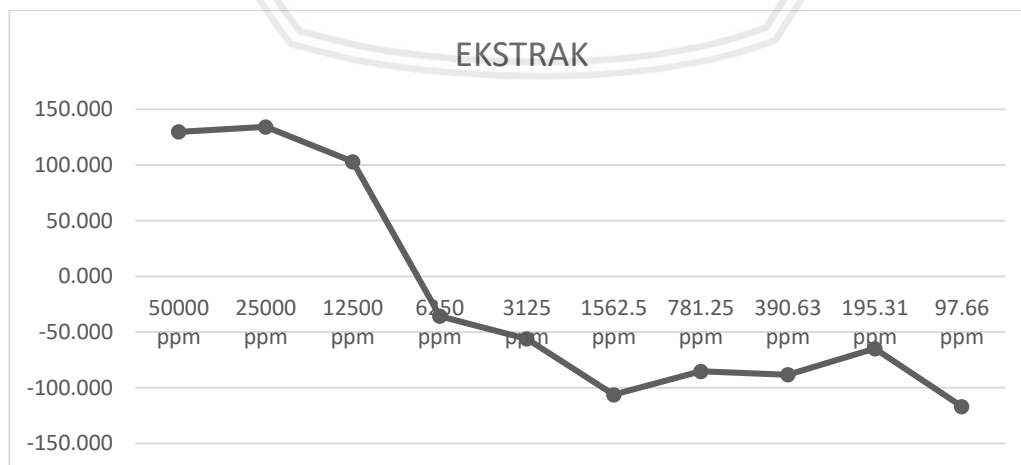
$$\begin{aligned} \text{Persen Hambat} &= \left(\frac{0,4198 - (-0,1245)}{0,4198} \right) \times 100 \% \\ &= \left(\frac{0,5443}{0,4198} \right) \times 100 \% \\ &= 129,657 \% \end{aligned}$$

Lampiran 11. Grafik Persen Hambat

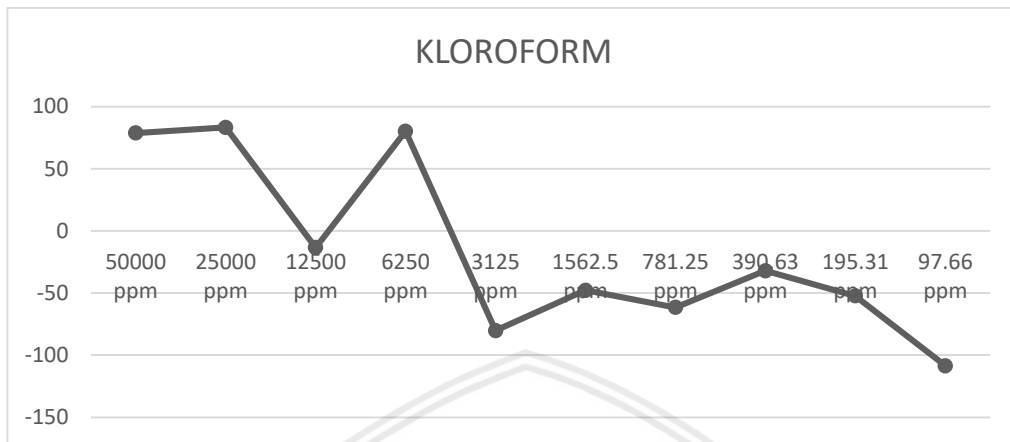
Lampiran 11.1 Grafik Persen Hambat Kontrol Positif



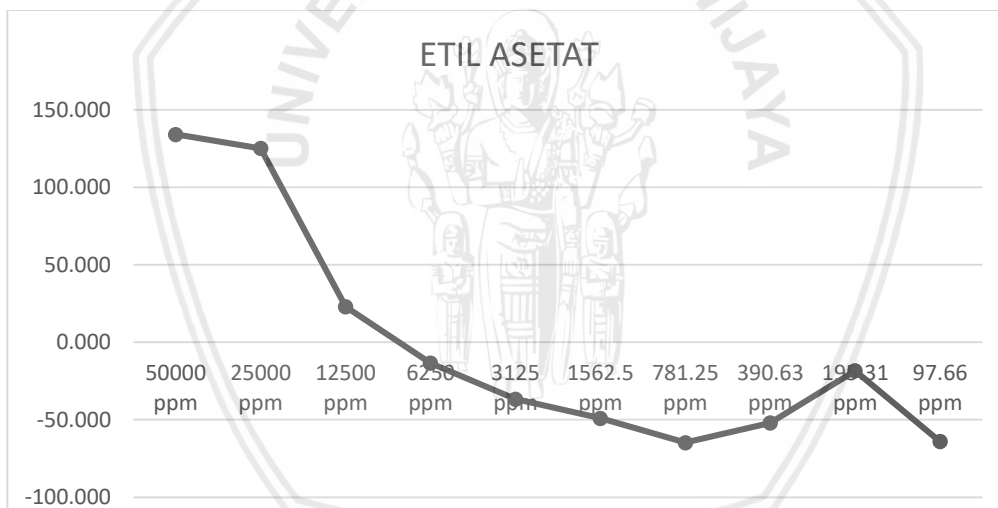
Lampiran 11.2 Grafik Persen Hambat Ekstrak Etanol 80%



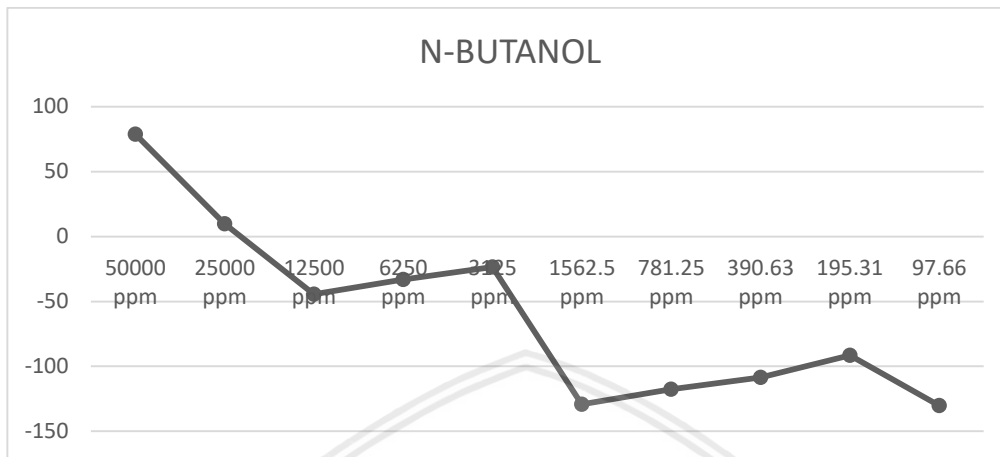
Lampiran 11.3 Grafik Persen Hambat Fraksi Kloroform



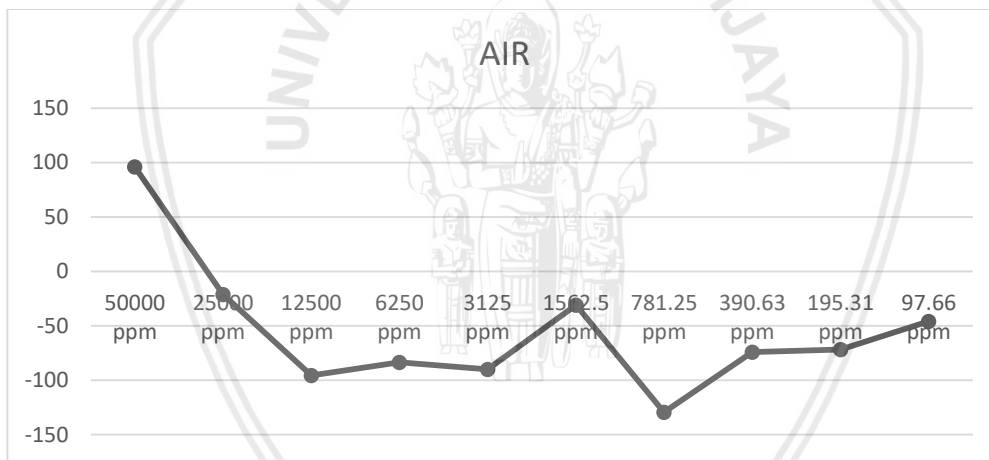
Lampiran 11.4 Grafik Persen Hambat Fraksi Etil Asetat



Lampiran 11.5 Grafik Persen Hambat Fraksi N-butanol

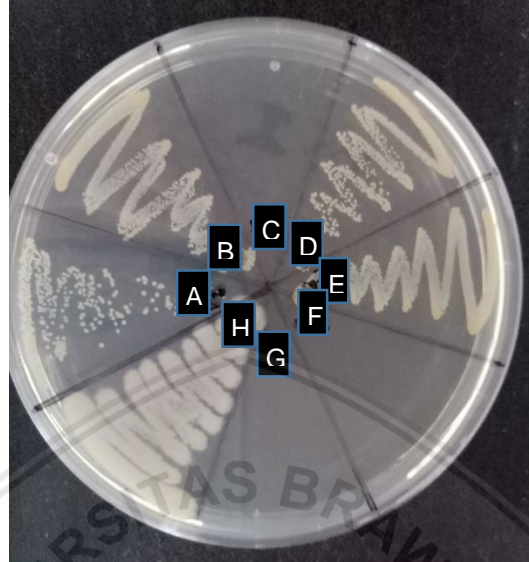


Lampiran 11.6 Grafik Persen Hambat Fraksi Air

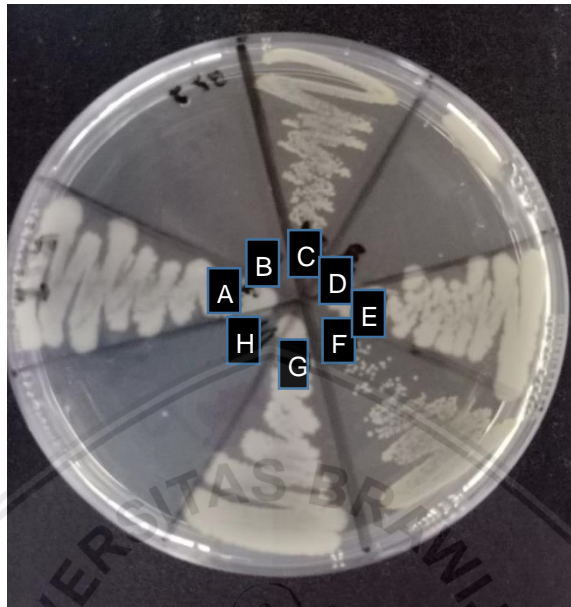


Lampiran 12. Gambar Plate Agar**L 12.1 Gambar Nutrient Plate Agar 1**

- Keterangan :
- A : Sampel Ekstrak konsentrasi 50000 ppm
 - B : Sampel Ekstrak konsentrasi 25000 ppm
 - C : Sampel Ekstrak konsentrasi 12500 ppm
 - D : Sampel Ekstrak konsentrasi 6250 ppm
 - E : Sampel Ekstrak konsentrasi 50000 ppm (replikasi 2)
 - F : Sampel Ekstrak konsentrasi 25000 ppm (replikasi 2)
 - G : Sampel Ekstrak konsentrasi 12500 ppm (replikasi 2)
 - H : Sampel Kloroform konsentrasi 50000 ppm

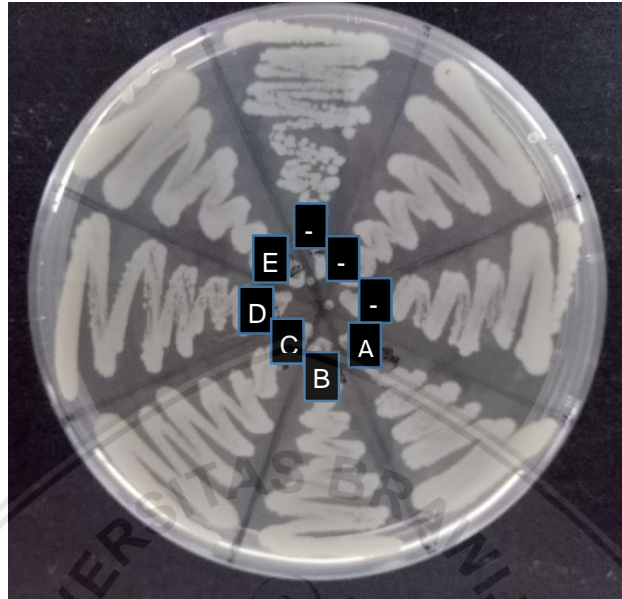
L 12.2 Gambar *Nutrient Plate Agar* 2

- Keterangan :
- A : Sampel Kloroform konsentrasi 25000 ppm
 - B : Sampel Kloroform konsentrasi 12500 ppm
 - C : Sampel Kloroform konsentrasi 50000 ppm (replikasi 2)
 - D : Sampel Kloroform konsentrasi 25000 ppm (replikasi 2)
 - E : Sampel Kloroform konsentrasi 12500 ppm (replikasi 2)
 - F : Sampel Etil Asetat konsentrasi 50000 ppm
 - G : Sampel Etil Asetat konsentrasi 50000 ppm
 - H : Sampel Etil Asetat konsentrasi 25000 ppm

L 12.3 Gambar Nutrient Plate Agar 3

- Keterangan :
- A : Sampel Etil Asetat konsentrasi 12500 ppm
 - B : Sampel Etil Asetat konsentrasi 50000 ppm (replikasi 2)
 - C : Sampel Etil Asetat konsentrasi 25000 ppm (replikasi 2)
 - D : Sampel N-butanol konsentrasi 50000 ppm
 - E : Sampel N-butanol konsentrasi 25000 ppm
 - F : Sampel N-butanol konsentrasi 50000 ppm (replikasi 2)
 - G : Sampel N-butanol konsentrasi 25000 ppm (replikasi 2)
 - H : Sampel N-butanol konsentrasi 50000 ppm (replikasi 2)

L 12.4 Gambar *Nutrient Plate Agar* 4



- Keterangan :
- A : Sampel Air konsentrasi 50000 ppm
 - B : Sampel Air konsentrasi 50000 ppm
 - C : Sampel Air konsentrasi 25000 ppm
 - D : Sampel Air konsentrasi 50000 ppm (replikasi 2)
 - E : Sampel Air konsentrasi 25000 ppm (replikasi 2)
 - : Kontrol Negatif
 - : Kontrol Negatif
 - : Kontrol Negatif