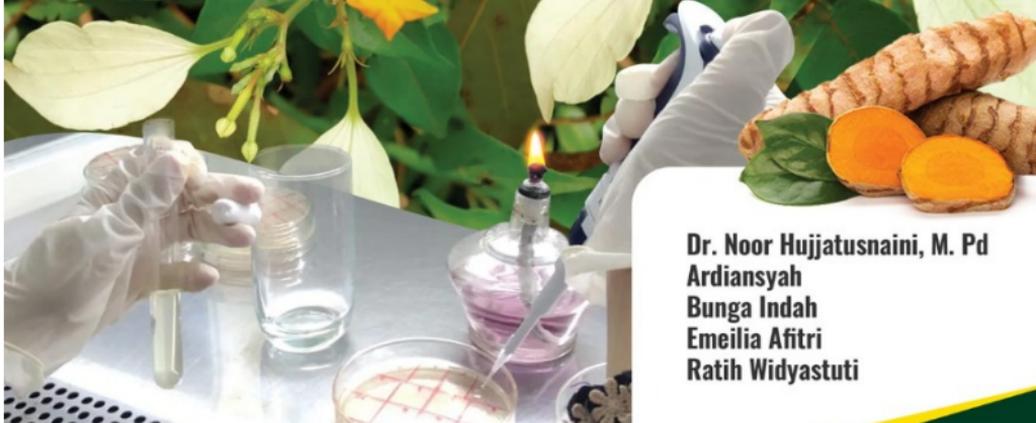


BUKU REFERENSI EKSTRAKSI



**Dr. Noor Hujjatusnaini, M. Pd
Ardiansyah
Bunga Indah
Emeilia Afitri
Ratih Widyastuti**

BUKU REFERENSI EKSTRAKSI

Buku Referensi Ekstraksi merupakan salah satu buku yang menyajikan tentang ekstraksi yang disusun berdasarkan hasil riset penelitian.

Pada bab pertama terdapat pendahuluan yang mencakup tentang latar belakang yaitu tentang mikroorganisme yang menyebabkan infeksi pada semua jaringan dan sistem organ, kemudian pada bab ini juga terdapat permasalahan, metode pemecahan masalah, tujuan dan manfaat.

Pada bab kedua berfokus pada metode dalam ekstraksi, ekstraksi merupakan suatu metode yang digunakan dalam proses pemisahan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan sejumlah pelarut sebagai pemisah. Dalam ekstraksi terdapat beberapa metode yang sering digunakan antara lain maserasi, perkolasi, refluks, Soxhletasi, infusa, dan masih banyak lagi.

Pada bab ketiga berfokus tentang teknik penguapan dan pengeringan, proses ini merupakan salah satu proses yang ada dalam ekstraksi yang bertujuan untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder yang baik.

Pada bab keempat tentang teknik pemisahan yang berfokus pada alat yang digunakan dalam teknik pemisahan, pemisahan merupakan teknik atau cara yang digunakan untuk mendapatkan dua atau lebih produk yang lebih murni dari suatu campuran senyawa kimia, dalam proses ini terdapat beberapa teknik yang disebut dengan teknik kromatografi.

Pada bab kelima berfokus tentang prosedur operasional dalam pemisahan atau yang disebut dengan kromatografi, dimana yang terdiri dari kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi lapis tipis-densitometer dan kromatografi lainnya.

Pada bab keenam berfokus pada hasil riset penelitian tentang formulasi kombinasi bahan alam terhadap mikroba penyebab infeksi, dimana bahan alam yang digunakan adalah Tambora, Sembalit Angin, dan Rimpang kunyit.



Insitut Agama Islam Negeri Palangkaraya
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jurusan MIPA- Program Studi Tadris Biologi
Januari 2021

Penulis

Dr. Noor Hujjatusnaini, M.Pd
Bunga Indah
Emelia Afitri
Ratih Widyastuti
Ardiansyah

Tim Editor

Nanik Lestariningsih, M.Pd

Penelaah

Nurul Septiana, M.Pd
Ayatussadah, M.Pd
Ridha Nirmalasari, M.Si

Desain Sampul

Yoga Hastiko Ardi

Buku referensi ini merupakan Dokumen Hasil Penelitian skripsi dalam payung penelitian dengan judul “Senyawa Metabolik Sekunder dan Formulasi Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Tambora, Sembalit Angin, dan Rimpang Kunyit Terhadap Bakteri Post Partum Sebagai Bahan Pengembangan Buku Referensi Tentang Ekstraksi”



Institut Agama Islam Negeri Palangkaraya
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jurusan MIPA- Program Studi Tadris Biologi
Januari 2021

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrohamanirrohim

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas Karunia dan HidayahNya, sehingga buku referensi berjudul “ekstraksi” ini dapat diselesaikan. Penyusunan buku referensi ini tidak lepas dari sumbangsih pemikiran, ide, dan saran akademik dari berbagai pihak, untuk itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada penelaah materi dan penelaah desain penyempurnaan buku referensi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah memberikan dukungan moril dan menjadi bagian dalam penyelesaian buku referensi ini. Buku referensi ini merupakan bagian dari skripsi (tugas akhir) dalam satu payung penelitian yang, sehingga tidak ada cetakan selanjutnya. Semoga buku referensi bermanfaat bagi mahasiswa dan pemerhati pendidikan secara umum.

KATA PENGANTAR

Infeksi bakteri pada masa post partum merupakan kasus penting dari mortalitas dan morbiditas yang cukup tinggi. Meningkat prevalensi bakteri resisten, ditambah pula dengan mahalnya obat sintetik meningkatkan morbiditas akibat infeksi bakteri pada masa post partum yang dapat menyebabkan kematian semakin besar, terutama di negara berkembang.. Penggunaan antibiotik terhadap beberapa infeksi menjadi salah satu pemicu munculnya multi strain yang resistan. Oleh karena itu, *back to nature* merupakan salah satu pemikiran yang harus dikembangkan untuk penyediaan pengobatan, yang minim dampak resiko medis, lebih hemat, dan relatif lebih mudah memperolehnya.

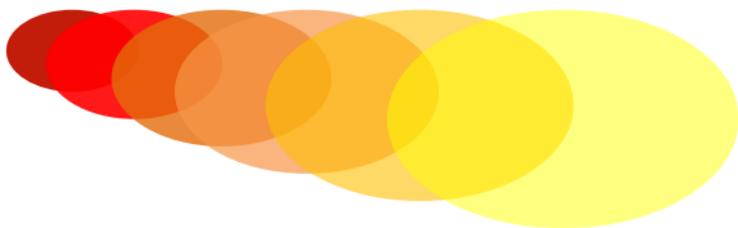
Kearifan lokal suatu bangsa dapat berbentuk budaya (Dimitrios *et al.*, 2019), adat istiadat (Koster, 2009), maupun jenis pangan tradisional dari suku tertentu (Saranraj *et al.*, 2019). Kekayaan budaya lokal harus dilestarikan secara turun temurun sebagai warisan budaya bangsa (Mazzocchi, 2006; Barbara, 2019; Anneke *et al.*, 2019; Tamang *et al.*, 2020). Oleh karena itu, penting upaya dokumentasi dari kearifan lokal tersebut. Indonesia merupakan negara yang kaya akan beragam bahan alam dan pengobatan tradisional yang dimiliki oleh berbagai suku, salah satunya suku Dayak di Kalimantan Tengah. Balia & Utama (2010) menyatakan kekayaan biodiversitas tersebut sebagai salah satu penciri dan kekayaan budaya bangsa Indonesia. Kalimantan Tengah memiliki beragam pengobatan

tradisional yang berbahan baku tumbuhan lokal, sebagai bahan dasar konsumsi pengobatan *per oral*, salah satunya adalah untuk pengobatan infeksi post partum atau pasca melahirkan.

Daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan Rimpang Kunyit merupakan salah satu formulasi kombinasi yang digunakan masyarakat suku Dayak di Kalimantan Tengah untuk mengatasi infeksi post partum. Informasi formulasi tersebut masih belum dibuktikan secara ilmiah, kendati telah menjadi pengobatan tradisional secara turun temurun. Penelitian payung ini berupaya menyajikan bahan informasi kajian formulasi kombinasi tersebut yang didasari dengan serangkaian prosedur laboratoris secara ilmiah. Informasi tersebut disusun berdasarkan kajian hasil riset dalam bentuk buku referensi yang berjudul “ekstraksi”, dengan harapan dapat mendokumentasikan kearifan lokal khas suku Dayak di Kalimantan Tengah.

Penulis mengharapkan buku referensi ini dapat bermanfaat secara luas di kalangan akademik, baik di lingkungan Perguruan Tinggi, maupun aplikatif di bidang kesehatan masyarakat. Penyusunan buku referensi ini secara komprehensif dibimbing dan divalidasi dari tim editor dan tim penelaah sebagai validator media dan materi.

Palangka Raya, Desember 2020



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
UCAPAN TERIMA KASIH	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	

BAB I PENDAHULUAN

BAB II METODE EKSTRAKSI

A. Maserasi	
B. Perkolasi.....	
C. Refluks.....	
D. Soxhletasi.....	
E. Infusa	
F. Dekoktasi	
G. Destilasi	
H. Lawan arah (<i>counter current</i>)	
I. Ultrasonik	
J. Gelombang mikro	
K. Ekstraksi gas superkritis	

BAB III TEKNIK PENGUAPAN DAN PENGERINGAN

A. Penguapan

1. Metode Pemanas Air
2. Metode Oven
3. Metode Hotplate
4. Metode Evaporator Tabung

B. Pengeringan

1. Pengeringan Beku (*freeze dryer*).....
2. Pengeringan semprot (*spray dryer*).....

BAB IV TEKNIK PEMISAHAN

1. Ekstraksi Cair-cair
2. Kromatografi Kertas
3. Kromatografi Lapis Tipis
4. Kromatografi Lapis Tipis Densitometer
5. Kromatografi Kolom
6. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
7. Kromatografi Gas-Cair

BAB V OPERATINAL TOOL PEMISAHAN PADA EKSTRAKSI

1. Ekstraksi Cair-cair
2. Kromatografi Kertas
3. Kromatografi Lapis Tipis
4. Kromatografi Lapis Tipis Densitometer
5. Kromatografi Kolom
6. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
7. Kromatografi Gas-Cair

BAB VI OPERATINAL TOOL PEMISAHAN PADA EKSTRAKSI

8. Ekstraksi Cair-cair

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1
2.2
2.3
2.4
2.5
2.6
3.1

DAFTAR TABEL

Gambar		Halaman
2.1	Deskripsi Sistem Imun	
2.2	Interaksi Antara Imunitas Non Spesifik dan Spesifik	
2.3	Interaksi Sistem Innate Immunity dan Adaptif Immunity	
2.4	Organ dan Jaringan Limfoid	
2.5	Sistem Imun Sekretori	
2.6	Morfologi dan Mekanisme Fungsi Sel M	
2.7	Sistem Imun Mukosa	
2.8	Struktur Lapisan Mukosa	
2.9	Struktur Lapisan Mukosa pada Saluran Pencernaan	
2.10	Limfosit Interepitelia	
2.11	Ekspresi Rantai IEL	
2.12	Lipopolisakarida	
2.13	Komponen Komplemen I (C1)	
2.14	Vaksin Sub Unit Multivalen	
3.1	Ekspresi Profil Protein Sub Unit Pili <i>Yersinia enterocolitica</i>	



BAB I PENDAHULUAN

Beragam infeksi yang dapat disebabkan oleh mikroorganisme, baik bakteri, khamir, ataupun virus. Mikroorganisme dapat menyebabkan infeksi pada semua jaringan dan sistem organ, salah satunya adalah pada sistem reproduksi wanita pasca melahirkan, atau dikenal dengan istilah “*post partum*”. Infeksi bakteri pada masa post partum merupakan kasus memiliki resiko kematian yang cukup tinggi. Upaya menekan resiko medis akibat infeksi mikroba dapat diatasi dengan menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotic dalam kurun waktu yang panjang dapat menyebabkan resistensi dan kemungkinan munculnya galur yang muliresisten. Peningkatan prevalensi resistensi bakteri, ditambah pula dengan mahalnya obat sintetik meningkatkan morbiditas akibat infeksi bakteri pada masa post partum yang dapat

menyebabkan kematian semakin besar, khususnya terjadi di negara-negara berkembang. Upaya menekan kemungkinan munculnya multi strain yang resistan, *back to nature* merupakan salah satu pemikiran yang harus dikembangkan untuk penyediaan pengobatan, yang minim dampak resiko medis, lebih hemat, dan relatif lebih mudah memperolehnya.

Penggunaan bahan alam lokal pada suatu daerah yang digunakan secara turun temurun merupakan bagian dari budaya. Kearifan lokal suatu bangsa dapat berbentuk budaya (Dimitrios *et al.*, 2019), adat istiadat (Koster, 2009), maupun jenis pangan tradisional dari suku tertentu (Saranraj *et al.*, 2019). Kekayaan budaya lokal harus dilestarikan secara turun temurun sebagai warisan budaya bangsa (Mazzocchi, 2006; Barbara, 2019; Anneke *et al.*, 2019; Tamang *et al.*, 2020). Oleh karena itu, penting upaya dokumentasi dari kearifan lokal tersebut. Indonesia merupakan negara yang kaya akan beragam bahan alam dan pengobatan tradisional yang dimiliki oleh berbagai suku, salah satunya suku Dayak di Kalimantan Tengah. Balia & Utama (2010) menyatakan kekayaan biodiversitas tersebut sebagai salah satu penciri dan kekayaan budaya bangsa Indonesia. Kalimantan Tengah memiliki beragam pengobatan tradisional yang berbahan baku tumbuhan

lokal, sebagai bahan dasar konsumsi pengobatan *per oral*, salah satunya adalah untuk pengobatan infeksi post partum atau pasca melahirkan.

Daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan Rimpang Kunyit merupakan salah satu formulasi kombinasi yang digunakan masyarakat suku Dayak di Kalimantan Tengah untuk mengatasi infeksi post partum. Informasi formulasi tersebut masih belum dibuktikan secara ilmiah, kendati telah menjadi pengobatan tradisional secara turun temurun. Tulisan ini berupaya menyajikan bahan informasi kajian formulasi kombinasi tersebut yang didasari dengan serangkaian prosedur laboratoris secara ilmiah. Informasi tersebut disusun berdasarkan kajian hasil riset, dengan harapan dapat mendokumentasikan kearifan lokal khas suku Dayak di Kalimantan Tengah

Beberapa permasalahan yang dapat diuraikan sebagai permasalahan dalam dalam tulisan ini antara lain, terkait eksplorasi metode dan mekanisme ekstraksi bahan alam yang tepat, mengetahui potensi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan Rimpang Kunyit terhadap pertumbuhan mikroba penyebab infeksi *post partum* pada pengobatan, serta formulasi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan Rimpang Kunyit yang

optimum dalam menghambat pertumbuhan mikroba penyebab infeksi *post partum* secara laboratoris.

Metode pemecahan masalah eksplorasi potensi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada bahan alam serta formulasi kombinasi antara daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan Rimpang Kunyit terhadap pertumbuhan mikroba penyebab infeksi *post partum* adalah melalui beberapa kajian teoritik dan analisa eksperimental laboratorium secara *in vitro*.

Tujuan akhir dari tulisan ini adalah memperoleh gambaran terkait mekanisme dan metode dan mekanisme ekstraksi bahan alam, menganalisis potensi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan Rimpang Kunyit terhadap pertumbuhan mikroba penyebab infeksi *post partum*, serta mengetahui formulasi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan Rimpang Kunyit yang optimum dalam menghambat pertumbuhan mikroba penyebab infeksi *post partum* secara laboratoris.



BAB II METODE EKSTRAKSI

Ekstraksi adalah suatu metode yang digunakan dalam proses pemisahan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan sejumlah pelarut sebagai pemisah (Aprillah, 2016). Ekstraksi merupakan salah satu teknik pemisahan kimia untuk memisahkan atau menarik satu atau lebih komponen atau senyawa-senyawa dari suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu yang sesuai. (Leba, 2017). Pada umumnya ekstraksi akan semakin baik apabila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan pelarut semakin luas. Dengan demikian, semakin halus serbuk simplisia maka akan semakin baik simplisianya (Febriana dan Oktavia, 2019). Terdapat berbagai cara dalam melakukan ekstraksi, diketahui masing-masing cara memiliki kelebihan dan

kekurangannya. Untuk memilih metode dilakukan dengan memperhatikan seperti sifat senyawa, pelarut yang digunakan, dan alat yang tersedia. Struktur untuk setiap senyawa, suhu dan tekanan adalah faktor yang perlu diperhatikan dalam melakukan ekstraksi (Hanan, 2015).

Ada beberapa istilah yang banyak digunakan dalam ekstraksi, antara lain ekstrak (yakni, pelarut yang digunakan untuk ekstraksi), rafinat (yakni, larutan senyawa atau bahan yang akan diekstraksi), dan linarut (yakni, senyawa atau zat yang diinginkan terlarut dalam rafinat). Metode ekstraksi yang digunakan tergantung pada jenis, sifat fisik dan sifat kimia kandungan senyawa yang akan diekstraksi. Pelarut yang digunakan tergantung pada polaritas senyawa yang akan disari, mulai dari yang bersifat nonpolar hingga polar, sering disebut sebagai ekstraksi bertingkat. Pelarut yang digunakan dimulai dengan heksana, petroleum eter, lalu selanjutnya kloroform atau diklometana, dikuti dengan alkohol, methanol, dan terakhir, apabila diperlukan digunakan di air. Simplisia dikumpulkan dan dibersihkan dari pengotor dengan cara pemilahan (pemisahan simplisia lain yang digunakan) atau pencucian. Dalam melakukan ekstraksi terhadap simplisia sebaiknya digunakan simplisia yang segar tetapi karena berbagai keterbatasan umumnya

dilakukan terhadap bahan yang telah dikeringkan. Kerja berbagai enzim yang terdapat dalam simplisia segar akan dihambat pada proses ekstraksi. Pengeringan simplisia dilakukan setelah kerja enzim dihambat dengan cara mencelupkan dalam methanol mendidih selama beberapa detik sehingga perubahan senyawa secara enzimatik dapat dicegah atau dikurangi. Cara pengeringan dipilih yang tidak mengakibatkan terjadinya perubahan metabolit baik secara kualitas ataupun kuantitatif. Pengeringan dilakukan secepat-cepatnya, selain pengaruh sinar matahari dengan suhu yang tidak terlalu tinggi. Salah satu contoh pengeringan yang sering dilakukan adalah dengan aliran udara. Sebelum simplisia diekstraksi, simplisia kering dapat disimpan dalam wadah tertutup rapat dan tidak terlalu lama, untuk mencegah timbulnya hama / kutu yang dapat merusak kandungan kimia. Pengecilan ukuran diperlukan agar proses ekstraksi berjalan cepat. Metode penyarian dan atau pemisahan, bahkan sampai pada pemurnian kandungan suatu senyawa yang dimaksud merupakan urutan pekerjaan yang dilakukan sebelum melakukan analisis struktur. Semakin banyak jenis senyawa kimia dalam suatu tumbuhan yang ditemukan, makin diperlukan juga suatu metode pemisahan yang lebih mutakhir yang dapat menyari senyawa dalam

jumlah kecil. Proses pemisahan merupakan langkah awal yang penting, karena keberhasilan proses berikutnya, baik untuk analisis ataupun penentuan struktur suatu senyawa hasil isolasi, sangat dipengaruhi oleh proses pemisahan.

Metode ekstraksi didasarkan ada atau tidaknya proses pemanasan dibagi menjadi dua macam yaitu ekstraksi cara dingin cara panas (Safitri *et al.*, 2018). Ekstraksi cara dingin pada prinsipnya tidak memerlukan pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung bertujuan agar senyawa yang diinginkan tidak menjadi rusak. Sedangkan ekstraksi cara panas melibatkan pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung bertujuan agar mempercepat proses ekstraksi (Rahayu, 2017).

Tujuan ekstraksi adalah menarik atau memisahkan senyawa dari campurannya atau simplisia. Terdapat berbagai cara ekstraksi yang telah diketahui masing-masing cara tersebut memiliki kelebihan dan kekurangannya. Pemilihan metode dilakukan dengan memperhatikan antara lain sifat senyawa, pelarut yang digunakan dan alat yang tersedia. Struktur untuk setiap senyawa, suhu dan tekanan merupakan faktor yang perlu diperhatikan dalam melakukan ekstraksi. Alkohol merupakan salah satu pelarut yang paling banyak dipakai untuk menyari secara total. Beberapa metode ekstraksi

yang umum digunakan antara lain: maserasi, perlokasi, refluks, soxhletasi, infusa, dekok, destilasi, lawan arah (*countercurrent*, ultrasonik, gelombang mikro (*microwave assisted extraction*, MAE). Dan ekstraksi gas superkritis (*supercritical gas extraction*, SGE). Berikut jabaran penjelasan masing-masing cara ekstraksi.

A. MASERASI

Maserasi adalah teknik ekstraksi simplisia yang dilakukan untuk bahan atau simplisia yang tidak tahan panas dengan cara merendam di dalam pelarut tertentu selama waktu tertentu. Maserasi dilakukan pada suhu ruang 20-30° C agar mencegah penguapan pelarut secara berlebihan karena faktor suhu dan melakukan pengadukan selama 15 menit agar bahan dan juga pelarut tercampur (Yennie dan Elystia, 2013).

Maserasi dikerjakan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari, cairan penyari tersebut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif tersebut akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka dari itu larutan yang terpekat didesak keluar (Rochani, 2009). Peristiwa tersebut berulang sehingga menyebabkan terjadi

keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Kinetik adalah cara ekstraksi, seperti maserasi yang dilakukan dengan pengadukan, sedangkan digesti adalah cara maserasi yang dilakukan pada suhu yang lebih tinggi dari suhu kamar, yaitu 40-60° C.

B. PERKOLASI

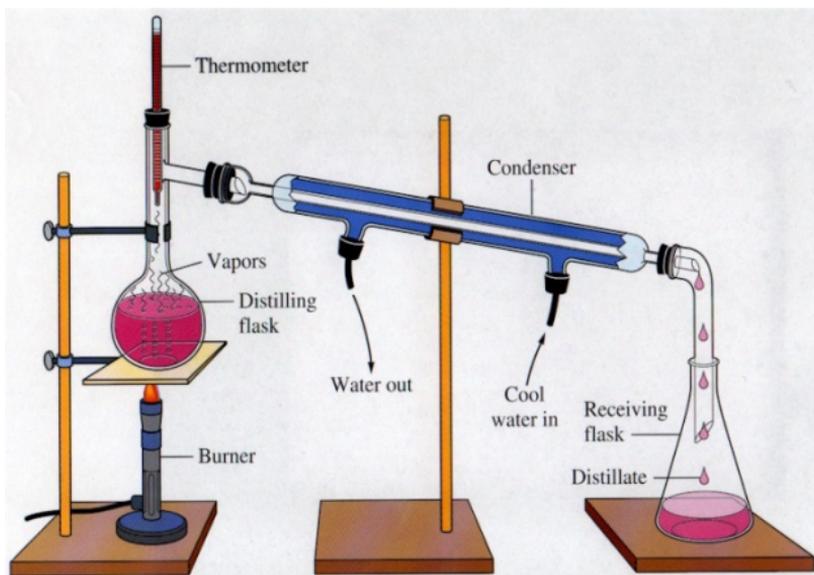
Perkolasi adalah suatu proses ketika simplisia yang sudah halus, diekstraksi dengan pelarut yang cocok dengan cara dilewatkan secara perlahan-lahan pada suatu kolom (Febriana dan Oktavia, 2019). Perkolasi merupakan ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan pada temperature ruangan. Prinsip perkolasi yaitu menempatkan serbuk simplisia pada suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat berpori (Irfan, 2018). Cara ini memerlukan waktu lebih lama dan pelarut yang lebih banyak. Untuk meyakinkan perlokasi sudah sempurna, perkolat dapat diuji adanya metabolit dengan pereaksi yang spesifik.



Gambar 2.1 Proses Perkolasi
(Sumber: Rosselita, 2020).

C. REFLUKS

Refluks merupakan metode ekstraksi yang dilakukan pada titik didih pelarut tersebut, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik, agar hasil penyarian lebih baik atau sempurna, refluks umumnya dilakukan berulang-ulang (3-6 kali) terhadap residu pertama. Cara ini memungkinkan terjadinya penguraian senyawa yang tidak tahan panas (Nirwana, 2019).

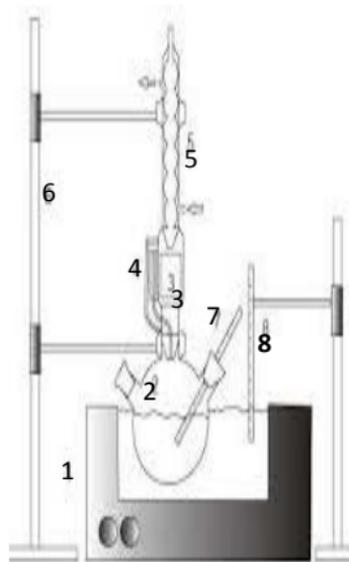


Gambar 2.2 Alat Ekstraksi Refluks
(Sumber: Sentrifus, 2014)

D. SOXHLETASI

Soxhlet merupakan metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang baru, biasanya dilakukan menggunakan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi konstan dengan adanya pendingin balik (Hanan, 2015). Adanya pemanasan menyebabkan pelarut ke atas kemudian setelah di atas akan diembunkan oleh pendingin udara menjadi tetesan-tetesan yang akan terkumpul

kembali dan bila melewati batas lubang pipa samping soxhlet, maka akan terjadi sirkulasi yang berulang-ulang akan menghasilkan penyarian yang baik. Dalam proses ekstraksi ini harus tepat untuk memilih pelarut yang akan digunakan. Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan berhubungan dengan ke-polaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi (Yurleni, 2018).



1. Waterbath
2. Labu leher tiga
3. Bahan yang diekstraksi
4. Soxhlet
5. Pendingin bola
6. Statif
7. Termometer (suhu pelarut)
8. Termometer (suhu waterbath)

Gambar 2.3 Alat Ekstraksi Soxhlet
(Sumber: Dewi *et al.*, 2018)

E. INFUSA

Infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi bahan nabati dengan pelarut air pada suhu 90°C selama 15 menit (Ambarwati, 2018). Umumnya infusa selalu dibuat dari simplisia yang mempunyai jaringan lunak seperti bunga dan daun, yang mengandung minyak atsiri, dan zat-zat yang tidak tahan dengan pemanasan lama (Karim, 2014).

F. DEKOKTASI

Dekoktasi merupakan ekstraksi dengan cara perebusan, dimana pelarutnya adalah air pada temperature $90-95^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit (Dahlia, 2019). Bentuk sediaan ini dapat disimpan pada suhu dingin untuk dipakai dalam jangka waktu yang lama dengan syarat tidak terjadi kontaminasi (Septiningsih, 2018).

G. DESTILASI (PENYULINGAN)

Destilasi merupakan suatu proses pemisahan campuran dari dua atau lebih cairan berdasarkan titik didih dari zat-zat penyusunannya (Tania, 2018). Zat yang memiliki titik didih lebih rendah akan menguap terlebih dahulu (Susanti, 2010). Pada proses pendinginan, senyawa dan uap air akan terkondensasi dan terpisah

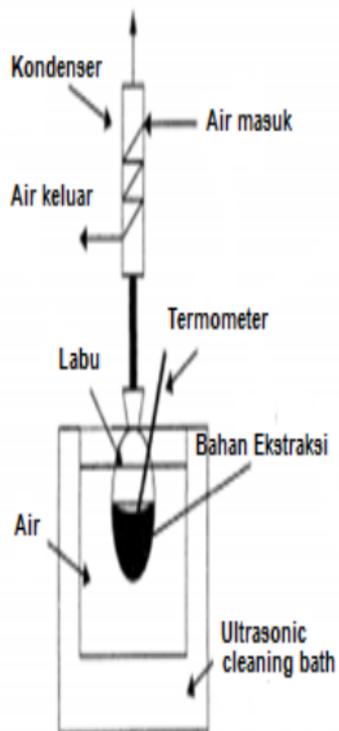
menjadi destilat air dan senyawa yang diekstraksi. Cara ini umum digunakan untuk menyari minyak atsiri dari tumbuhan.

H. LAWAN ARAH (*COUNTER CURRENT*)

Cara ekstraksi ini serupa dengan cara perkolasi, tetapi simplisia bergerak berlawanan arah dengan pelarut yang digunakan. Cara ini banyak digunakan untuk ekstraksi herbal dalam alat besar.

I. ULTRASONIK

Ekstraksi ultrasonik melibatkan penggunaan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20-2000 KHz sehingga permeabilitas dinding sel meningkat dan isi sel keluar. Frekuensi getaran memengaruhi hasil ekstraksi. Hal inilah yang menyebabkan proses ekstraksi dengan menggunakan gelombang ultrasonik menjadi lebih cepat dari metode konvensional. Medium yang dilewati akan mengalami getaran dimana disebabkan oleh gelombang elektronik. Getaran yang diberikan gelombang ultrasonik akan memberikan pengadukan yang intensif terhadap proses ekstraksi (Sari *et al.*, 2012).



Gambar 2.4 Skema Peralatan Proses Ekstraksi Ultrasonik

(Sumber: Fuadi, 2012)

J. GELOMBANG MIKRO (*MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION, MAE*)

Ekstraksi menggunakan gelombang mikro (2450 MHz) merupakan ekstraksi yang selektif dan digunakan untuk senyawa yang dimiliki dipol polar. Cara ini dapat menghemat waktu ekstraksi dibandingkan dengan cara konvensional seperti maserasi, dan menghemat pelarut. Metode ini memiliki keuntungan yaitu waktu ekstraksi yang lebih cepat, lebih efisien, serta gelombang mikro yang terdapat di *microwave* dapat meningkatkan suhu pelarut pada bahan, yang dapat menyebabkan dinding sel pecah dan zat-zat yang terkandung di dalam sel keluar menuju pelarut, sehingga rendemen yang dihasilkan meningkat (Time, 2014).

K. EKSTRAKSI GAS SUPERKRITIS (*SUPERCRITICAL GAS EXTRACTION, SGE*)

Metode ekstraksi dilakukan menggunakan CO₂ dengan tekanan tinggi, dan banyak digunakan untuk ekstraksi minyak atsiri atau senyawa yang bersifat mudah menguap atau termolabil. Penggunaan karbondioksida (CO₂) lebih disukai karena bersifat inert, toksisitasnya

rendah. Teknologi superkritis CO₂ relatif cepat, efisien, dan selektivitas ekstraksi dapat dikontrol dengan densitas pelarut, biaya rendah, dan memberikan hasil ekstraksi yang lebih baik (Agustia *et al.*, 2019).



BAB III TEKNIK PENGUAPAN DAN PENGERINGAN

Penguapan dan pengeringan merupakan teknik yang ada pada proses ekstraksi. Kedua teknik tersebut dilakukan dengan tujuan akan didapatnya syawa metabolit sekunder yang bagus sebagai obat antibakteri, adapun dari kedua teknik tersebut dibahas dalam paragraph berikut: Proses evaporasi merupakan perpindahan kalor ke zat cair mendidih yang sangat sering ditemukan sehingga biasanya ditangani sebagai satu cara tersendiri. Tujuan evaporasi yaitu untuk memekatkan larutan yang terdiri dari zat terlarut yang tak mudah menguap dan pelarut yang mudah menguap. Evaporasi dilaksanakan dengan

menguapkan sebagian dari pelarut sehingga didapatkan larutan cair pekat yang konsentrasinya lebih tinggi.

Proses dari teknik pengeringan merupakan salah satu proses dari sekian proses yang ada dalam tahapan ekstraksi yang dimana tujuan dari pengeringan adalah agar didapatnya ekstrak yang stabil dan terjamin.

A. PENGUAPAN

Evaporasi atau biasa disebut dengan penguapan, penguapan merupakan tahap yang ada pada proses ekstraksi. Proses penguapan ini dilakukan dengan memberi kalor ke zat cair agar menguapkan sebagian dari pelarut didapatkan larutan cair pekat yang konsentrasinya lebih tinggi, dimana zat tadi terdiri dari zat terlarut yang mudah menguap dan tak mudah menguap sehingga jika dilakukan pemanasan maka akan terjadi pengurangan dari ekstrak dan menguapkan zat yang mudah menguap tadi dan meninggalkan ekstrak yang lebih pekat dengan konsentrasi senyawa lebih besar dan memudahkan penyimpanan.

Penguapan dilakukan sebelum ekstrak diproses lebih lanjut, pemisahan atau fraksinasi. Proses pemanasan dapat dilakukan dengan berbagai macam yaitu :

1. Metode Pemanas Air

Cara yang paling mudah dari sekian banyak cara yaitu dengan menggunakan penangas air, dimana dengan cara menyimpan ekstrak di dalam wadah diletakan di atas pemanas air memerlukan waktu yang cukup lama kemungkinan terjadi senyawa yang terurai.

2. Metode Oven

Cara penguapan dengan menggunakan oven ini sangatlah cocok digunakan untuk penguapan yang kadar cairannya tidak terlalu banyak. Penguapan oven memiliki kelebihan yang dimana suhu dapat diatur dan disesuaikan dengan titik didih cairan penyari.

3. Metode Hot Plat

Cara yang ke tiga yaitu penguapan menggunakan Hot Plat dimana cara ini dapat digunakan dengan mudah seperti menggunakan cara penangas air. Pada penggunaan cara ini ekstrak di taruh di dalam wadah gelas kimia yang steril dan pemanasan ini memerlukan waktu yang cukup lama dan kelebihan dari cara ini kita dapat mengontrol suhu ekstrak menggunakan thermometer yang dimasukan kedalam ekstrak, dan digantung menggunakan

penyanggah agar ujung thermometer tidak menentuhkan dari gelas kimia, hal tersebut dilakukan agar suhu yang kita ukur mendapatkan data yang akurat.



Gambar 3.1 Hot Plat dan Termometer
(Sumber: Almega, 2019)

4. Metode Evaporator Tabung

Evaporator tabung dimana alat ini merupakan alat yang moderen dimana alat ini memiliki bentuk seperti

tabung. Alat ini bekerja pada suhu rendah sekitar 40-50⁰C dan dibantu dengan alat vakum udara sehingga titik didih pelarut sangat rendah. Penguapan ini bekerja dengan sangat cepat sehingga kemungkinan terjadinya penguraian senyawa yang termolabil dapat dihindari sehingga senyawa yang ada tetap optimal. Berikut merupakan gambar dari alat evaporator:



Gambar 3.2 Alat Uap Evaporator

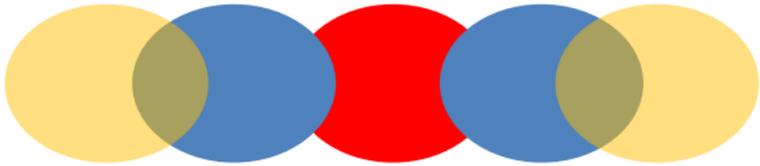
(Sumber: Sugiono I., 2014)

B. PENGERINGAN

Ekstrak yang kental didapat dari proses penguapan yang dimana dapat dilanjutkan kembali ke tahap

selanjutnya yaitu tahap pengeringan. Tahap pengeringan ini dapat dilakukan dengan cara yang sederhana ataupun cara yang moderen. Cara yang sederhana dapat dilakukan dengan menggunakan pemangas air dan aliran udara panas, akan tetapi cara ini sulit dilakukan apabila larutan penyaringnya adalah air. Sedangkan cara yang moderen bisa menggunakan alat yang moderen pula dimana pengeringan moderen ada 2 yaitu :

1. Pengeringan beku (*Freeze dryer*) dimana bekerja pada suhu rendah atau beku, pada proses pengeringan beku ini memerlukan waktu yang relative lama. Senyawa fenolik sangat cocok dengan pengeringan beku ini karena sifatnya yang tidak stabil dan rentang terjadi degradasi, Faktor degradasi paling utama adalah suhu, kandungan oksigen dan cahaya
2. Pengeringan semprot (*Spray dryer*) , Pengeringan semprot ini bekerja pada suhu yang tinggi. Pengeringan ini biasa digunakan pada senyawa yang stabil pada suhu tinggi.



BAB IV

TEKNIK PEMISAHAN

Proses pemisahan merupakan teknik atau cara yang digunakan untuk mendapatkan dua atau lebih produk yang lebih murni dari suatu campuran senyawa kimia. Secara mendasar proses pemisahan dapat dijelaskan sebagai proses perpindahan massa. Dalam proses pemisahan terdapat berbagai cara atau metode yang dapat digunakan mulai dari yang sederhana hingga canggih dalam menganalisis fitokimia baik kualitatif maupun kuantitatif.

Proses pemisahan dipilih berdasarkan pada kondisi yang dihadapi, terutama dalam proses pemisahan kandungan kimia tumbuhan harus memperhatikan sifat-sifat golongan atau senyawa yang akan dipisahkan. Salah satu metode yang digunakan dalam proses pemisahan adalah kromatografi. Kromatografi merupakan pemisahan

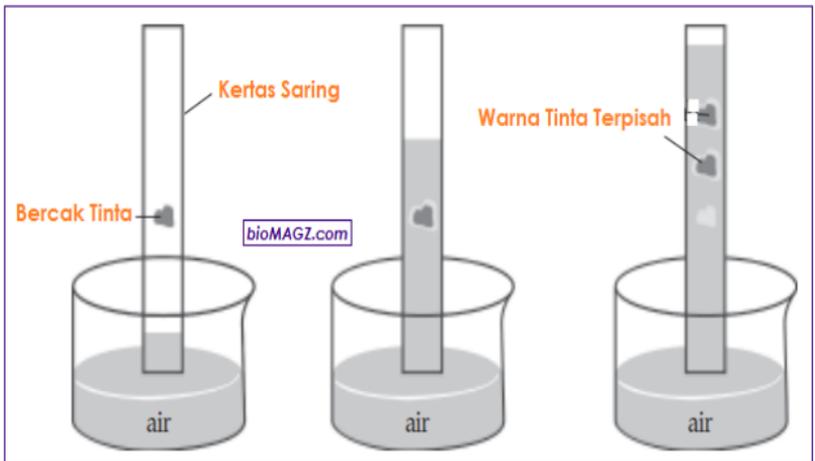
campuran senyawa dalam suatu sampel berdasarkan perbedaan interaksi sampel dengan fase diam dan fase gerak, dalam kromatografi untuk teknik pemisahan senyawa yang mana metode ini sangat beragam yang menyangkut berbagai ranah di luar pemisahan itu sendiri. Diantara beragamnya proses kromatografi begitu pula alat yang digunakan pada setiap metode kromatografi.

Metode kromatografi yang umumnya digunakan antara lain kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis digunakan untuk tujuan identifikasi karena caranya yang mudah dan sederhana. Kromatografi kolom untuk pemisahan senyawa dalam jumlah relatif banyak dan fase diam yang digunakan lebih beragam. Alat yang diperlukan pada ketiga jenis kromatografi ini sederhana, sedangkan gas dan kromatografi cair kinerja tinggi memerlukan peralatan yang lebih rumit dan umumnya merupakan metode dengan resolusi yang tinggi, serta bahan uji yang diperlukan dalam jumlah μg .

A. KROMATOGRAFI KERTAS

Pada Kromatografi kertas, fase diam (penjerap) adalah sehelai kertas dengan susunan serabut dan memiliki ketebalan yang sesuai. Berbagai jenis kertas

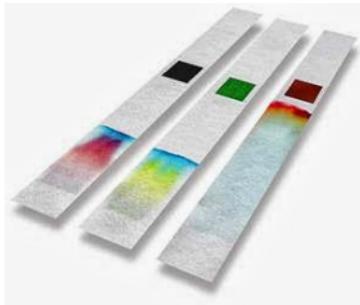
untuk kromatografi diperdagangkan, dan berdasarkan pada tujuan penggunaan. Untuk pemisahan asam amino yang perambatannya perlahan, fase diam yang digunakan memiliki laju alir (*flow rate*) yang cepat. Akan tetapi, untuk tujuan lain pada umumnya digunakan fase diam yang memiliki laju alir medium. Pemisahan pada kromatografi kertas (KK) dapat menggunakan fase gerak tunggal atau campuran. Kromatografi dapat dilakukan secara menaik (fase gerak mengalir akibat adanya gaya gravitasi), atau secara dua arah. Proses pemisahan dalam kromatografi ini disebut partisi.



Gambar 4.1 Kromatografi Kertas

Peralatan yang digunakan pada kromatografi kertas antara lain:

- a. Kertas kromatografi merupakan kertas saring yang memiliki ketebalan dengan ukuran tertentu.



Gambar 4.2 Kertas Kromatografi

- b. Bejana kromatografi, bejana kromatografi terbuat dari kaca, tertutup rapat, kedap uap, memiliki lubang yang dimaksudkan untuk memasukkan cairan pelarut atau fase gerak atau mengurangi tekanan dalam bejana. Bejana dapat berbentuk silinder atau kotak.
- c. Bak pelarut, bak pelarut terbuat dari kaca dengan ukuran sedikit lebih pendek daripada ukuran bejana dan lebih panjang daripada ukuran kertas yang digunakan. Bak pelarut dapat diisi dengan sejumlah volume fase gerak. Posisi bak pelarut di bawah apabila merupakan kromatografi kertas menaik

B. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

Kromatografi lapis tipis, KLT merupakan suatu metode analisis yang digunakan untuk memisahkan suatu campuran senyawa secara tepat dan sederhana. Pemisahan yang terjadi pada kromatografi lapis tipis (KLT) berdasarkan pada adsorpsi, partisi atau kombinasi kedua efek, tergantung pada jenis lempeng, fase diam dan gerak yang digunakan. Pada umumnya, KLT lebih banyak digunakan untuk tujuan identifikasi karena cara ini sederhana dan mudah, serta memberikan pilihan fase gerak yang lebih beragam. Manfaat lain dari KLT adalah untuk analisis kuantitatif dan isolasi skala preparat. Lempeng kaca atau aluminium digunakan sebagai penunjang fase diam. Fase gerak akan merayap sepanjang fase diam dan terbentuklah kromatogram, yang dikenal juga sebagai kromatografi kolom terbuka.

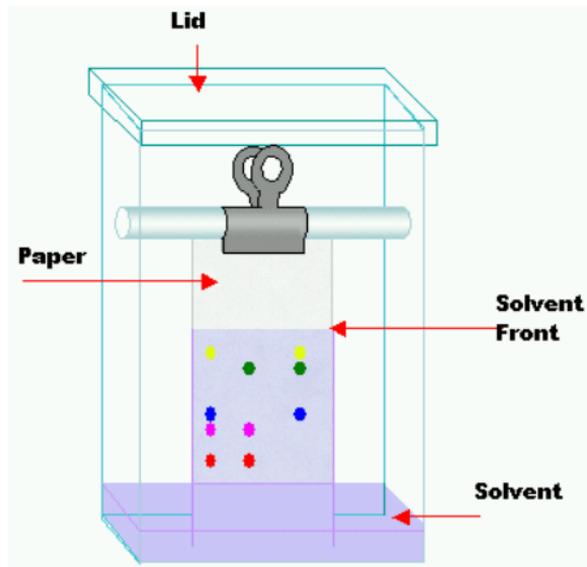
Pada fase diam pada dasarnya jenis padatan yang digunakan yaitu

- silika gel seperti asam amino, alkaloid, asam lemak dan lain-lain,
- Alumina seperti alkaloid, zat warna, fenol dan lainnya.
- Selulosa seperti asam amino, alkanoid dan lain-lain.

Pada fase diam dan fase gerak hanya digunakan bersama-sama dalam KLT ketika proses kromatografi berlangsung melalui kesetimbangan yang melibatkan lapisan tipis adsorben, fase pelarut, dan fase uap pelarut. Sifat-sifat ideal pelarut yang digunakan dalam KTL yaitu:

- 1) Tersedia dalam bentuk yang sangat murni dengan harga yang memadai
- 2) Tidak bereaksi dengan komponen dalam sampel maupun materialis fase diam
- 3) Memiliki viskositas dan tegangan permukaan yang sesuai
- 4) Memiliki titik didih yang rendah untuk memudahkan pengeringan setelah pengembangan
- 5) Mempunyai kelarutan yang ideal pada berbagai campuran solvent
- 6) Tidak toksik dan mudah pembuangan limbahnya

Peralatan yang digunakan dalam kromatologi lapis tipis antara lain:



Gambar 4.3 Kromatografi Lapis Tipis

Bagian-bagian dari alat kromatografi lapis tipis antara lain:

- a. Lempengan kromatologi, lempeng terbuat dari aluminium atau kaca dengan ukuran umumnya 20 x 20 cm, tebal lapisan 0,10-0,25 mm. Lempeng siap pakai banyak tersedia dalam perdagangan, atau dapat disiapkan sendiri. Untuk tujuan preparatif, lempeng

yang dipakai atau digunakan memiliki ketebalan lapisan hingga 1 mm.

- b. Rak penyimpanan, rak penyimpanan berfungsi untuk meletakkan lempeng apabila perlu pemanasan untuk mengaktifkan fase daun.
- c. Bejana Kromatografi. Bejana digunakan sebagai tempat untuk meletakkan lempeng pada posisi tegak, bagian bawahnya datar, tempat sejumlah fase pengembangan, sedangkan bagian atasnya dapat ditutup dengan rapat. Ukuran bejana yang akan dipakai dapat disesuaikan dengan ukuran lempeng yang digunakan. Penjenuhan bejana diperlukan untuk memperoleh pemisahan yang baik.
- d. Pipet mikro (*micro-syrige*). Pipet digunakan untuk menotolkan larutan bahan uji dan larutan perbandingan dalam jumlah yang dikehendaki, contohnya 10,20 μl .
- e. Alat penyemprot pereaksi atau larutan deteksi. Alat ini umumnya terbuat dari kaca dan digunakan untuk menyemprotkan pereaksi ke lempeng. Larutan yang keluar dalam bentuk butir-butir halus.
- f. Lampu ultraviolet. Lampu digunakan untuk melakukan pengamatan lempeng panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

C. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS – DENSITOMETER

Kromatografi lapis tipis dapat digunakan dalam analisis kuantitatif suatu senyawa hasil pemisahan, yaitu dengan mengukur besar dan intensitas bercak. Alat yang dipakai untuk tujuan tersebut antara lain adalah densitometer. Dalam densitometer, lempeng KLT dapat digerakkan sepanjang sumbu x dan x sumbu y. Alat optik yang digunakan sebagai sumber cahaya mampu menghasilkan cahaya monokromatis dan foto sel dengan sensitivitas yang sesuai untuk mengukur pantulan. Pada penetapan kadar diperlukan larutan standar yang diketahui konsentrasinya.



Gambar 4.4 Densitometer

D. KROMATOGRAFI KOLOM

Kromatografi kolom merupakan salah satu metode pemisahan senyawa yang masih digunakan. Senyawa yang dipisahkan menggunakan kromatografi kolom memiliki mekanisme yang sama dengan metode kromatografi lainnya yaitu berkaitan dengan perbedaan antara gaya-gaya antar molekul dalam sampel dengan fase gerak dan antara komponen dengan fase diam. Kromatografi kolom dilakukan berdasarkan adsorpsi senyawa-senyawa dari suatu campuran yang memiliki afinitas berbeda-beda pada permukaan fase diam atau penjerap. Fase gerak yang dialirkan akan melarutkan dan membawa komponen-komponen dalam campuran dengan kecepatan yang berbeda-beda sesuai dengan afinitas komponen terhadap penjerat.

Kromatografi kolom biasanya digunakan untuk memisahkan suatu campuran senyawa dalam jumlah relatif banyak, tergantung pada diameter dan panjang kolom yang digunakan. Hal yang mempengaruhi keberhasilan pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom adalah pemilihan adsorben dan eluen atau pelarut, dimensi kolom yang digunakan serta kecepatan elusi yang dilakukan. Pada kecepatan laju alir atau elusi sebaiknya

dibuat konstan. Kecepatan tersebut harus cukup lambat agar senyawa berada dalam keseimbangan antara fase diam dan fase gerak. Dalam kolom konsentrasi di fase gerak dan fase diam akan menyebar secara homogen walau masih bergantung pada sifat fisika dan kimia masing-masing komponen.

Peralatan yang digunakan dalam kromatografi kolom, antara lain:

- a. Tabung atau kolom kaca yang memiliki ukuran tertentu dan lubang untuk keluarnya fase gerak setelah melewati fase diam. Kecepatan alir fase gerak dapat diatur sesuai kebutuhan. Kolom berisi fase diam yang sudah siap digunakan dan terendam dalam suatu pelarut organik.



Gambar 4.5 Tabung atau Kolom Kaca

- b. Tempat penampungan fase gerak yang keluar, besar atau volume yang dipakai disesuaikan dengan setiap volume yang dikehendaki.
- c. Alat kromatografi lapis tipis (KTL) lengkap yang digunakan untuk mendeteksi senyawa yang berada dalam tempat penampung.

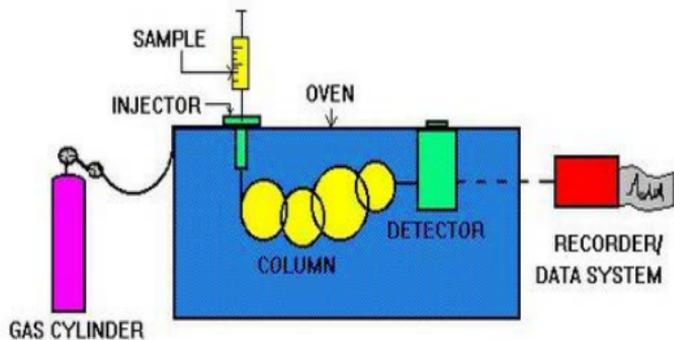
E. KROMATOGRAFI GAS-CAIR

Kromatografi gas merupakan teknik yang digunakan dalam pemisahan campuran berdasarkan perbedaan koefisien partisi dari senyawa yang diuapkan antara fase cair dan fase gas yang dilewatkan dalam kolom dengan bantuan gas. Kromatografi gas-cair menggunakan (*gas liquid chromatography*) merupakan fase diam berupa lapisan tipis zat cair pada zat padat yang inert, sedangkan kromatografi gas-padat (*gas solid chromatography*) menggunakan fase diam berupa zat padat yang aktif, contohnya alumina dan silika gel.

Senyawa yang mudah menguap masuk kedalam kolom, lalu terdistribusi di antara fase gas dan fase cair atau padat, resolusi pada kromatografi gas ditentukan oleh efisiensi kolom dan fase gerak. Kolom memengaruhi lebar puncak, dan pelarut menentukan letak puncak

kromatogram.penggunaan kromatografi gas dalam identifikasi harus disertai dengan larutan pembanding yang memiliki waktu retensi suatu puncak yang sama dengan senyawa yang dianalisis. Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan ukuran luas puncak.

Peralatan yang digunakan pada kromatografi gas-cair, antara lain:



Gambar 4.6 Kromatografi Gas-Cair

- Silender. Merupakan tempat gas pembawa atau fase gerak, dan dilengkapi dengan katup pengatur tekanan, seperti helium, nitrogen atau gas inert lain.
- Injektor atau alat suntik, digunakan untuk memasukkan bahan uji ke dalam kolom. Agar bahan

- uji berbentuk uap, tempat penyuntikan harus dipanaskan dengan suhu yang cukup tinggi agar terjadi penguapan dengan cepat, tetapi jangan terlalu tinggi sehingga tidak menyebabkan bahan terurai.
- c. Kolom, terbuat dari kaca atau logam tahan karat, ditempatkan pada suatu kotak pemanas yang suhunya dapat disesuaikan dan dipertahankan dalam waktu tertentu, suhu dapat diatur agar eluasi senyawa berjalan efisien sehingga komponen senyawa dapat keluar dari kolom secara terpisah.
 - d. Alat alir gas, alat ini digunakan untuk mengatur laju alir fase gerak. Laju alir gas yang keluar dari kolom dihitung, dan umumnya dinyatakan dalam ml per menit pada tekanan atmosfer dan suhu kamar.
 - e. Detektor, alat ini dipilih yang memiliki kepekaan tinggi dan selektif. Umumnya digunakan detektor ionisasi nyala dengan gas fase gerak helium atau nitrogen.

F. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

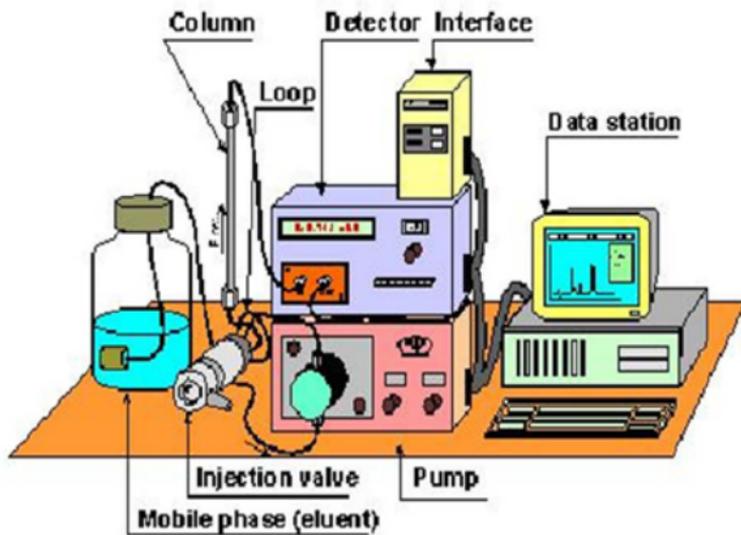
Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yaitu alat yang digunakan dalam pemisahan, sebagai hasil proses partisi, adsorpsi, atau penukaran ion, tergantung pada

jenis fase diam yang digunakan. Alat ini memiliki kepekaan yang tinggi serta dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif secara bersamaan. Teknologi kolom memerlukan sistem pompa tekanan tinggi yang mampu mengalirkan fase gerak pada tekanan tinggi hingga 300 atmosfer. Jumlah bahan uji yang akan dipisahkan dengan kromatografi hanya sekitar 20 µg. Cara identifikasi senyawa dalam KCKT pada dasarnya sama dengan yang digunakan pada kromatografi gas. Pada KCKT diperlukan fase gerak berkualitas tinggi dan sebaiknya sebelum dipakai, terlebih dahulu dihilangkan kandungan gas yang mungkin terdapat didalamnya. Jenis dan komposisi fase gerak memengaruhi kinerja kromatografi dan resolusi senyawa dalam campuran bahan uji. Waktu proses pemisahan berlangsung, komposisi pelarut dapat diubah secara berkessinambungan atau yang disebut juga dengan eluasi gradien atau pengaturan pelarut.

Kelebihan dari penggunaan kromatografi cair kinerja tinggi yaitu, mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, mudah dalam melaksanakannya, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, dapat menghindari terjadinya dekomposisi atau keruakan bahan

yang akan dianalisis, resolusi yang baik, dapat digunakan pada bermacam-macam detektor, kolom dapat digunakan kembali, dan mudah melakukannya “*sample recorveri*”.

Peralatan yang digunakan dalam kromatografi cair kinerja tinggi, antara lain:



Gambar 4.7 Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

- a. Pompa, digunakan untuk mengalirkan fase gerak dari tempatnya ke dalam kolom dengan pipa yang

memiliki tekanan tinggi. Umumnya tekanan hingga 5000 psi dengan laju alir yang dapat disesuaikan, kurang lebih 10 ml per menit.

- b. Injektor, alat ini merupakan tempat untuk memasukkan larutan uji, dapat dioperasikan secara manual atau otomatis. Larutan uji perlu disaring sebelum disuntukkan ke injektor.
- c. Kolom, kolom memiliki ukuran diameter 2-5 mm dan berisi fase diam. Ada dua jenis fase diam yaitu fase diam bersifat polar (fase normal) dan nonpolar (fase terbalik), fase gerak merupakan campuran pelarut, dengan polaritas yang dapat diatur sesuai keperluan, dengan cara mengubah komposisinya. Untuk tujuan preparatif, kolom yang digunakan memiliki diameter lebih besar.
- d. Detektor. Alat detektor yang umum digunakan adalah spektrofotometer. Alat ini terpasang pada bagian akhir kolom. Radiasi sinar ultraviolet akan melawatisuatu sel ke detektor. Bahan uji yang dianalisis setelah melewati kolom masuk ke dalam sel untuk menyerap radiasi, dan menghailkan perubahan tingkat energi yang dapat diukur.

- e. Pengumpul data. Alat ini digunakan untuk mengumpulkan data yang merupakan kromatografi lengkap dengan tinggi dan lua puncak, identifikasi bahan uji dan variabel metode.

G. Identifikasi Senyawa Metabolit

Identifikasi suatu senyawa dalam tumbuhan diperlukan proses ekstraksi, pemisahan, dan pemurnian. Hasil proses pemurnian yang merupakan senyawa murni diidentifikasi dengan penentuan golongan. Hal ini dapat dilakukan dengan menggunakan reaksi warna, nilai Rf, dan pola spektrum ultraviolet. Warna kelompok senyawa kadang merupakan prediksi awal suatu senyawa, seperti warna kuning dari kelompok flavonoid. Kemurnian suatu senyawa hasil isolasi dapat ditentukan dengan melihat pergerakannya (nilai Rf) menggunakan beberapa sistem fase gerak dalam kromatografi kertas dan KLT. Sifat fisis ditentukan dengan mengukur beberapa parameter, antara lain titik didih atau titik leleh, indeks bias, dan putaran optik. Data yang diperoleh dapat dibandingkan dengan melihat data pada pustaka. Pada hidrolisis menggunakan asam yang terkadang juga memerlukan enzim untuk proses glikosida. Identifikasi lebih lanjut ditentukan

menggunakan metode spektrometri, dengan mengukur spektrum ultraviolet (UV), inframerah (IM), massa (SM), dan resonansi magnetik inti (RMI=NMR). Struktur senyawa kimia dapat ditentukan dengan menggunakan data-data spektrum tersebut. Untuk lebih meyakinkan, dapat dilakuka pengubahan kimia dan dijadikan senyawa yang sudah dikenal atau senyawa turunannya.

Beberapa spektrum identifikasi suatu senyawa yang umum digunakan antara lain:

1) Spektrum ultraviolet

Spektrofotometer ultraviolet-sinar tampak dapat digunakan dalam mengidentifikasi dan penentuan kuantitatif suatu senyawa. Pada identifikasi perlu dilakukan dengan memebandingkan spektrum serapan, panjang gelombang maksimum, dan daya serap (a), $E_R^{1\%}_{1cm}$. Penggunaan pelarut saat menentukan spektrum serapan perlu diperhatikan. Pemilihan pelarut tidak memberikan absorpsi inar pada daerah panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum senyawa yang akan diidentifikasi. Pengukuran spektrum perlu dilakukan berulang dengan kondisi pelarut yang berbeda, yaitu dengan penambahan basa atau asam. Penambahan basa yang

mengakibatkan terjadinya pergeseran batokrom (ke arah panjang gelombang lebih besar) dan peningkatan absorbansi menunjukkan pergeseran hipsokrom (ke arah panjang gelombang lebih kecil).

Kemungkinan terjadinya suatu proses reduksi atau hidrolisis dapat diamati dengan pengukuran serapan setelah jangka waktu tertentu. Beberapa golongan senyawa memiliki spektrum senyawa yang spesifik, seperti antosianin, flavonoid maupun antrakuinon. identitas senyawa uji dapat diketahui dengan perbandingan data pustaka. Beberapa senyawa berwarna memberikan absorpsi pada sinar tampak. Contohnya klorofil, karotenoid, dan sitokrom. Penentuan spektrum pada panjang gelombang maksimum senyawa uji bermanfaat untuk penetapan kadar. Panjang gelombang maksimum dapat diketahui dengan melakukan pembuatan spektrum serapan. Pembuatan kurva kalibrasi ditentukan dengan menggunakan larutan standar yang dipakai dalam beberapa konsentrasi bertingkat.



Gambar 4.8 Ultraviolet Spektrofotometer

2) Spektrum inframerah

Spektrum inframerah suatu senyawa merupakan sidik jari molekul senyawa tersebut. Suatu senyawa memiliki ikatan dan frekuensi vibrasi yang berbeda sehingga menimbulkan spektrum yang spesifik untuk tiap senyawa. Pengukuran spektrum infra merah dilakukan bentuk padat dalam campuran dengan kalium bromida, atau bentuk cair dalam kloroform atau minyak nuyol. Pembentukan cakram tipis dilakukan dengan alat cetakan khusus dengan pengempa. Skrining dilakukan pada bilangan

gelombang 4000 hingga 667 cm^{-1} (2,5-15 nm). Spektrum sidik jari senyawa terletak pada daerah di bawah 1200 cm^{-1} , ditimbulkan dari getaran seluruh molekul, sedangkan getaran gugur fungsi atau ikatan kimia terjadi pada spektrum di atas 1200 cm^{-1} . Manfaat dari spektrum ini yaitu, banyak gugus fungsi yang memiliki frekuensi getaran pada bilangan gelombang khusus.



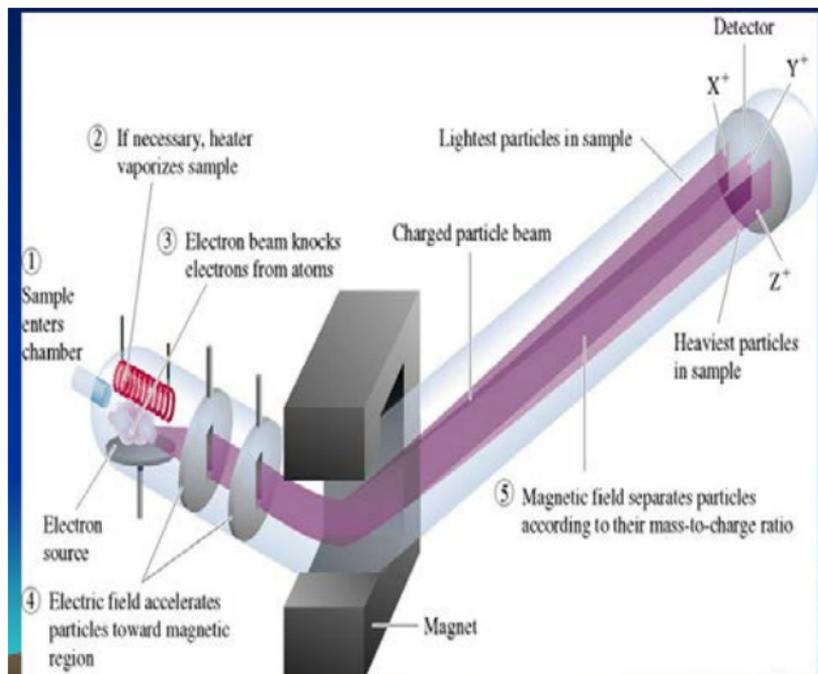
Gambar 4.9 Alat Spektrum Inframerah

3) Spektrum massa

Alat spektrometer massa dipakai untuk mengukur massa molekul relatif (bobot molekul) suatu senyawa dan mendeteksi pola fragmentasinya. Dengan mengetahui bagian mana dari suatu molekul yang mengalami fragmentasi, gugus-gugus yang ada dalam senyawa yang dianalisis dapat ditentukan. Fragmentasi yang terjadi sering berupa pola spesifik suatu senyawa sehingga dapat diidentifikasi. Dalam pengukuran suatu senyawa awalnya terjadi perubahan bentuk molekul senyawa menjadi bentuk gas yang kemudian diubah menjadi ion.

Kemudian proses pemisahan ion terjadi sesuai dengan perbandingan massa terhadap muatan (m/e) yang terdeteksi dan tercatat oleh detektor. Ion-ion yang mengandung isotop juga muncul sebagai puncak (*peak*), meskipun hanya dalam kelimpahan yang relatif kecil. Puncak-puncak yang ditimbulkan oleh isotop biasanya muncul pada $(M + 1)$, $(M + 2)$ dan seterusnya. Umumnya senyawa organik memiliki bobot molekul genap jika tidak mengandung nitrogen atau sejumlah atom nitrogen ganjil.

Penggunaan spektrometer massa ini sangat membantu dalam elusidasi struktur (selain IM dan RMI), dengan memperoleh data m/e dengan akurasi yang tinggi.



Gambar 4.10 Skema Alat Spektrometer Massa

4) Spektrum resonansi magnetik inti (RMI)

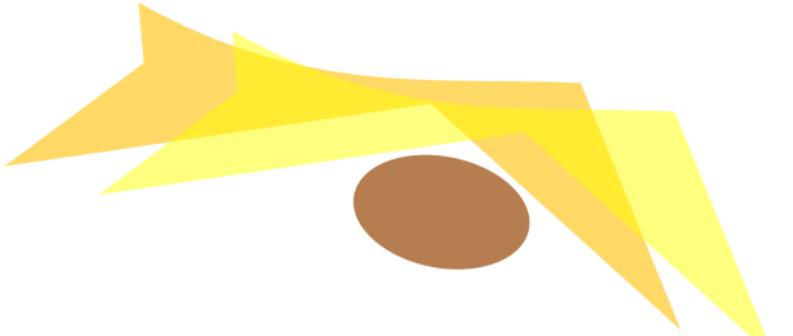
Spektrum resonansi magnetik inti (RMI) menggambarkan banyaknya jenis lingkungan atom hidrogen yang berbeda dalam satu molekul, jumlah atom hidrogen pada masing-masing jenis lingkungan hidrogen, serta jumlah atom hidrogen, serta jumlah atom hidrogen yang terdapat pada atom karbon tetangga. Sinyal resonansi yang muncul merupakan akibat dari proton suatu senyawa dalam lingkungan kimia berbeda, dan antarsinyal dipisahkan dengan geseran kimia (*chemical shift*). Sinyal yang keluar dapat berupa gasir tunggal atau *singlet* (s), *doublet* (d), *triplet* (t), dan seterusnya mengikuti pola *splitting* spesifik yang disebabkan interaksi magnetik antara suatu inti dan inti lainnya. Luas daerah di bawah masing-masing sinyal berbanding lurus dengan jumlah proton yang menghasilkan sinyal tersebut. Luas area ini dinyatakan sebagai garis vertikal pada masing-masing sinyal. Tinggi integrasi berbanding lurus dengan luas area di bawah sinyal sesuai dengan perbandingan (rasio) jumlah atom hidrogen pada masing-masing proton.

Alat yang dipakai biasanya disebut spektrometer resonansi magnetik inti proton (RMI proton = *NMR*

proton), sedangkan informasi tentang sifat kerangka karbon dalam molekul diambil menggunakan RMI karbon. Pengukuran RMI karbon diperlukan untuk menganalisis glikosida guna penentuan ikatan antara berbagai bagian gula dan konfigurasinya. Umumnya setiap atom karbon dalam suatu molekul senyawa dapat ditetapkan sinyanya yang spesifik. Atom karbon yang memiliki substitusi berbeda menunjukkan geseran kimia yang khas. Penentuan struktur suatu senyawa memerlukan data spektrum RMI (proton dan karbon). Untuk digabungkan dengan data cara spektroskopi lain sehingga saling melengkapi.



Gambar 4.11 Alat Spektrum RMI



BAB V

PROSEDUR OPERASIONAL

PEMISAHAN EKSTRAKSI

Ekstraksi merupakan proses yang menggunakan pelarut organik untuk memisahkan suatu bahan dari campuran. Pemisahan memiliki beberapa cara dalam analisis fitokimia baik kualitatif ataupun kuantitatif. Cara pemisahan tersebut dari yang sederhana hingga canggih. Metode pemisahan dipilih berdasarkan sifat-sifat golongan atau senyawa yang akan dipisahkan. Beberapa metode pemisahan pada ekstraksi yaitu ekstraksi cair-cair, kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, kromatografi gas, dan kromatografi cair kinerja tinggi. Berdasarkan alat yang diperlukan,

kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi kolom memerlukan alat yang lebih sederhana dibandingkan kromatografi gas dan kromatografi cair kinerja tinggi. Hal itu karena kromatografi gas dan kromatografi cair kinerja tinggi memerlukan peralatan yang lebih rumit.

A. KROMATOGRAFI KERTAS

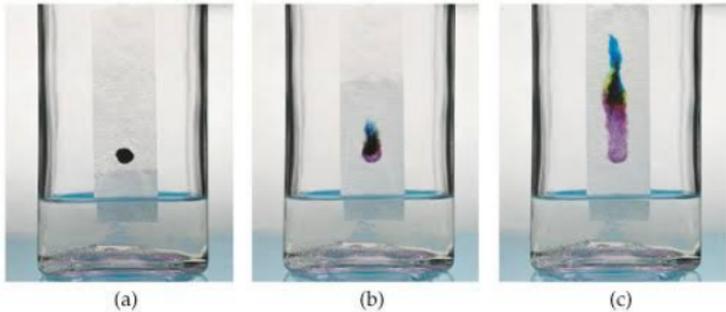
Kromatografi kertas termasuk jenis kromatografi cair-cair. Prinsip pemisahan pada kromatografi kertas adalah distribusi atau partisi senyawa-senyawa diantara dua cairan yang tidak saling mencampur. Kertas khusus yang memiliki susunan serabut dan ketebalan yang sesuai digunakan sebagai fase diam (penjerap) pada kromatografi kertas. Beberapa jenis kertas bisa digunakan bahkan diperdagangkan sesuai dengan tujuan penggunaanya untuk kromatografi. Umumnya fase diam yang digunakan memiliki laju alir medium. Namun untuk tujuan tertentu, misalnya untuk pemisahan asam amino, fase diam yang digunakan memiliki laju alir cepat. Fase gerak tunggal atau campuran digunakan pada kromatografi kertas. Kromatografi dapat dilakukan secara menaik dan menurun. Secara menaik yaitu fase gerak

merambat naik pada kertas yang ditarik melalui gaya kapiler, sedangkan secara menurun yaitu fase gerak mengalir akibat adanya gaya gravitasi. Kromatografi juga dapat dilakukan secara dua arah. Pemisahan dalam kromatografi ini disebut partisi. Terdapat teknik dalam kromatografi kertas, yaitu proses pengeluaran asam mineral dari kertas, biasanya disebut desalting. Desalting merupakan teknik dimana cairan dibiarkan bergerak menuruni kertas akibat gravitasi.

Kromatografi kertas mempunyai sistem kromatografi yang sangat sederhana. Hal itu karena hanya diperlukan sepotong kertas, tinta warna, dan pelarut dalam suatu bejana saja. Sebenarnya, kertas pada kromatografi hanya sebagai penyokong. Penyokong fase diam melibatkan instrumentasi yang rumit. Prinsip kerja kromatografi kertas yaitu senyawa yang terlarut dalam fase gerak akan melewati fase diam yang terletak pada suatu padatan pendukung. Gerakan senyawa tersebut terjadi karena adanya gaya kapilaritas dari padatan pendukungnya. Gerakan dalam suatu senyawa tergantung kelarutannya pada fase diam.

Berikut ini merupakan cara kerja menggunakan kromatografi kertas:

- 1) Cuplikan atau larutan bahan uji ditotolkan secara hati-hati pada tepi bawah kertas yang telah diberi tanda.
- 2) Kertas yang telah diberi totolan dimasukkan ke dalam bejana yang telah diisi dengan sistem pelarut yang telah dipilih. Pada kromatografi menaik, ujung kertas bagian bawah dicelupkan ke dalam fase gerak sehingga fase gerak merambat naik. Pada kromatografi menurun, ujung kertas bagian bawah dimasukkan pada bak fase gerak menggunakan bantuan batang kaca antisifon (kertas tergantung dalam bejana tanpa menyentuh dinding bejana dan rak). Bejana harus sudah dijenuhkan terlebih dahulu agar pengisian bak fase gerak dapat dilakukan.
- 3) Setelah perambatan mencapai jarak yang ditentukan, bejana dibuka, kertas dikeluarkan dan diletakkan pada rak pengering, lalu dikeringkan.
- 4) Kromatogram diamati tanpa disemprot atau dengan disemprot larutan pereaksi yang sesuai. Cara ini digunakan untuk analisis kuantitatif.



Gambar. 5.1 Kromatografi Kertas

B. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis tergantung jenis lempeng, fase diam, dan gerak yang digunakan. Karena itu pemisahan pada kromatografi lapis tipis berdasarkan adsorpsi, partisi atau kombinasi kedua efek. KLT digunakan untuk identifikasi, hal itu karena KLT memiliki cara yang sederhana dan mudah. Fase gerak pada juga KLT beragam. KLT juga bisa digunakan untuk analisis kuantitatif dan isolasi skala preparatif. Fase diam pada KLT ditunjang oleh lempeng kaca atau aluminium. Metode pemisahan ini sederhana, cepat, dan sensitif. Umumnya fase diam yang dipakai pada KLT adalah silika gel yang ditambah dengan kalsium sulfat. Kedua bahan tersebut dipakai agar daya lekat fase diam bertambah.

Fase gerak pada KLT biasanya monokomponen atau multikomponen, tetapi sebaiknya tidak lebih dari 4 jenis. KLT memiliki resolusi yang lebih tinggi dibandingkan kromatografi kertas. Hal itu karena pada lapisan fase gerak memiliki laju difusi yang sangat kecil. Zat-zat warna terlihat langsung, tetapi pereaksi penyemprot juga bisa digunakan untuk melihat bercak warna yang timbul.

KLT memiliki kromatogram berupa bercak-bercak yang setelah visualisasi terpisah, baik dengan pereaksi deteksi atau tanpa pereaksi deteksi pada sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Kromatogram memiliki jarak rambat senyawa yang biasanya dinyatakan dengan nilai R_f (*retardation factor*). Cara menghitung R_f sebagai berikut:

$$R_f = \frac{x}{y}$$

Keterangan :

R_f = Retardation factor

x = Jarak rambat senyawa dari titik awal penotolan hingga pusat bercak

y = Jarak rambat fase gerak dari titik awal penotolan hingga garis depan

Umumnya hasil dari penghitungan nilai R_f adalah berupa pecahan. Beberapa kegunaan yang masih dimiliki oleh kromatografi lapis tipis adalah pemeriksaan identitas kemurnian senyawa obat, pemeriksaan simplisia baik tanaman dan hewan, pemeriksaan komposisi dan komponen aktif sediaan obat, dan penentuan kuantitatif masing-masing senyawa aktif campuran senyawa obat.

Berikut cara kerja dari kromatografi lapis tipis:

- a. Larutan yang dijadikan bahan uji atau pembanding disiapkan terlebih dahulu. Kemudian ditotolkan pada lempeng (jarak setiap totol sekitar 1-1,5 cm) dengan volume tertentu dan jarak dari tepi bawah lempeng sekitar 1,5 hingga 2 cm. Totolan diusahakan memiliki diameter yang kecil dan dibiarkan mengering. Jika menghendaki jarak rambat tertentu sebaiknya diberi tanda.
- b. Lempeng yang sudah diberikan totolan bahan uji dimasukkan ke dalam bejana (sudah dijenuhkan dengan fase gerak), posisinya tegak dan bagian tepi bawah tercelup dalam fase gerak, namun totolan tidak sampai terendam.

- c. Tutup rapat bejana dan biarkan fase gerak merambat sampai batas jarak rambat.
- d. Lempeng dikeluarkan dari bejana dan langsung dikeringkan di udara. Sinar tampak, yaitu ultraviolet pada panjang gelombang 254nm dan 366nm membuat bercak yang timbul terlihat. Selanjutnya jarak rambat setiap bercak yang timbul dan terlihat diukur dan dicatat. Fase gerak dari titik penotolan hingga diperoleh nilai R_f atau R_x (R_x = jarak rambat bercak dibagi jarak rambat pembanding) juga diukur dan dicatat.
- e. Tahap pengamatan bagian d diulangi dan lempeng disemprot menggunakan pereaksi yang sesuai. Warna yang timbul atau terjadi selalu dicatat setiap pengamatan. Pengamatan yang dilakukan setelah penyemprotan terkadang memerlukan suhu yang lebih tinggi. Hal itu agar pembentukan warna lebih optimum. Suhu yang stabil atau sama diperlukan setiap melakukan pengamatan.

Catatan: jika melakukan KLT dua arah, sebelum dimasukkan pada fase gerak kedua, lempeng dikeringkan dulu dari fase gerak pertama.

C. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS-DENSITOMETER

Lempeng KLT dalam densitometer bisa digerakkan sepanjang sumbu x dan sumbu y. Alat optik yang digunakan mampu menghasilkan cahaya monokromatis dan foto sel dengan sensitivitas yang sesuai untuk mengukur pantulan. Kadar ditetapkan dengan memerlukan larutan standar yang diketahui konsentrasinya.

D. KROMATOGRAFI KOLOM

Pemisahan berdasarkan adsorpsi senyawa-senyawa dari suatu campuran yang memiliki afinitas berbeda-beda pada permukaan fase diam. Tekniknya bergantung pada kombinasi antara fase diam dan fase gerak yang ditentukan, sehingga interaksi yang muncul juga sama demikian. Kromatografi kolom memiliki karakter, yaitu fase diam yang padat, seperti silika gel, alumina, dan karbon aktif, dan fase gerak yang cair, seperti aseton dan etanol. Fase gerak akan melarutkan dan membawa komponen-komponen dalam campuran dengan kecepatan yang berbeda-beda sesuai dengan afinitas komponen terhadap penjerap. Kromatografi kolom digunakan untuk

memisahkan suatu campuran senyawa dalam jumlah relatif banyak, tergantung diameter dan panjang kolom yang digunakan. Hasil pemisahan dipengaruhi oleh ukuran partikel fase diam dan tingkat aktivitas penjerap. Silika gel, aluminium oksida dan sefads digunakan dalam fase diam. Kolomnya dapat diisi secara kering atau basah. Cara kering dilakukan dengan memasukkan fase diam dalam keadaan kering, kemudian fase gerak dimasukkan hingga fase diam terendam. Cara basah dilakukan dengan memasukkan fase diam dalam bentuk suspensi. Fase gerak yang dipakai dapat terdiri dari satu atau campuran pelarut dalam berbagai perbandingan jumlah tertentu atau dimasukkan secara bertingkat. Hasil dari kolom dikumpulkan berdasarkan waktu atau volume yang ditampung. Hasil tersebut berupa fraksi-fraksi senyawa (eluat) yang ditampung pada bagian bawah kolom. Hasil pemisahan yang sempurna bisa diperoleh jika melakukan pemilihan fase diam dan fase gerak secara tepat dan sesuai. Faktor penting dalam pemilihan tersebut adalah polaritas dan kelarutan.

Berikut cara kerja kromatografi kolom:

- a. Kolom dapat diisi dengan fase diam secara basah atau kering

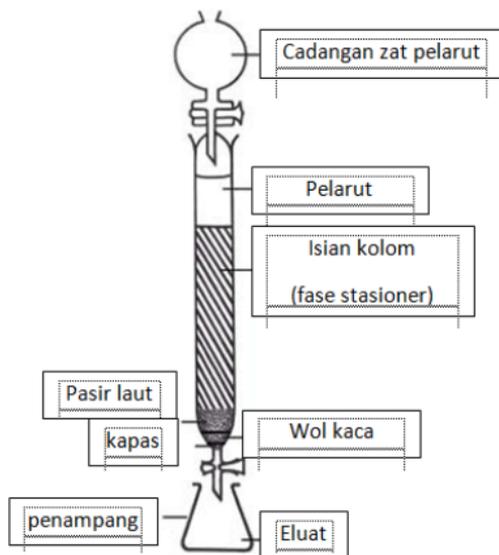
1) Secara basah

Kolom disiapkan dengan meletakkan dan memampatkan kapas atau wol gelas pada dasar tabung. Tabung yang diisi fase gerak akan digunakan, sedangkan fase diam disuspensikan dalam fase gerak. Fase gerak dibiarkan mengalir secara perlahan, sebelumnya keran dibuka terlebih dahulu. Setelah itu suspensi dituangkan ke dalam kolom. Usahakan kecepatan penuangan selalu sama. Partikel fase diam akan turun secara perlahan, diharapkan tidak ada udara yang terjepit dalam lapisan fase diam. Diamkan selama 2-3 jam dalam posisi terendam fase gerak sebelum kolom digunakan untuk pemisahan.

2) Secara kering

Fase diam bentuk kering dimasukkan ke dalam tabung atau kolom yang sudah disiapkan dengan meletakkan kapas atau wol gelas pada dasar tabung. Penuangan dilakukan secara teratur agar partikel-partikel fase diam membentuk lapisan yang rata. Kemudian fase gerak dituangkan dalam kolom secara perlahan hingga membasahi fase diam. Biarkan fase diam terendam dan usahakan tidak ada udara yang terserap.

- b. Ekstrak atau bahan uji dimasukkan ke bagian atas fase diam dalam bentuk serbuk kering halus atau bentuk cair dalam fase gerak. Jumlah bahan disesuaikan kapasitasnya dengan kemampuan fase diam untuk memisahkan.
- c. Keran dibuka dan fase gerak mulai mengalir. Cairan yang keluar mulai ditampung.
- d. Kandungan dalam setiap tabung penampung dideteksi menggunakan KLT.



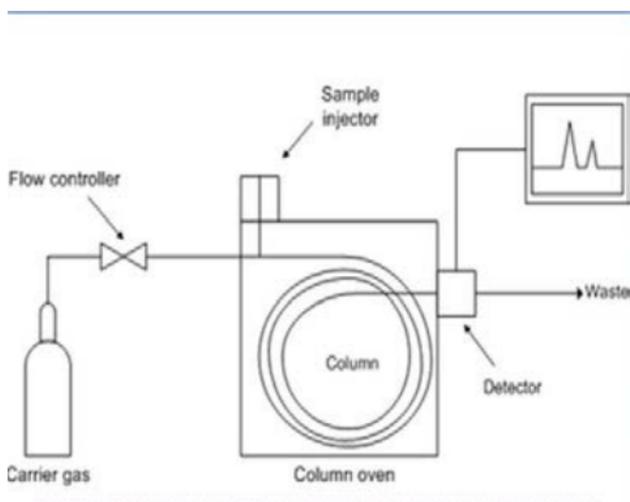
Gambar. 5.2 Kromatografi Kolom

E. KROMATOGRAFI GAS-CAIR

Kromatografi gas-cair biasa disingkat GLC. Fase gerak dalam GLC adalah gas dan umumnya helium, hidrogen, atau nitrogen. Koefisien distribusi (K) pada kromatografi gas cenderung besar (misal: 1000) karena fase gerak bersifat inert. Koefisien distribusi merupakan konstanta kesetimbangan yang menyatakan rasio konsentrasi tiap komponen antara dua fase. Kromatografi gas-cair menggunakan fase diam berupa lapisan tipis zat cair pada zat padat yang inert, sedangkan kromatografi gas-padat menggunakan fase diam berupa zat padat yang aktif, contohnya silika gel dan alumina. Senyawa yang mudah menguap dalam kolom terdistribusi di antara fase gerak dan fase cair atau padat. Efisiensi kolom dan fase gerak menentukan resolusi. Kolom mempengaruhi lebar puncak, sedangkan pelarut mempengaruhi posisi puncak kromatogram. Identifikasi menggunakan kromatografi gas harus disertai dengan larutan pembanding. Larutan tersebut memiliki waktu retensi suatu puncak yang sama dengan senyawa yang dianalisis. Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan ukuran luas puncak.

Berikut cara kerja kromatografi gas-cair:

- a. Kolom disesuaikan dengan suhu yang akan digunakan dan dapat bertahan dalam waktu tertentu. Peningkatan suhu secara bertahap juga dilakukan.
- b. Laju alir fase gerak diatur sesuai dengan keperluan.
- c. Bahan uji dimasukkan dalam injektor dengan suhu yang sudah disesuaikan.
- d. Kromatogram yang terjadi berupa suatu puncak yang timbul dalam waktu retensi (t_r) masing-masing komponen berbeda, kemudian dibandingkan dengan waktu retensi bahan pembanding.



Gambar. 5.3 Kromatografi Gas Cair

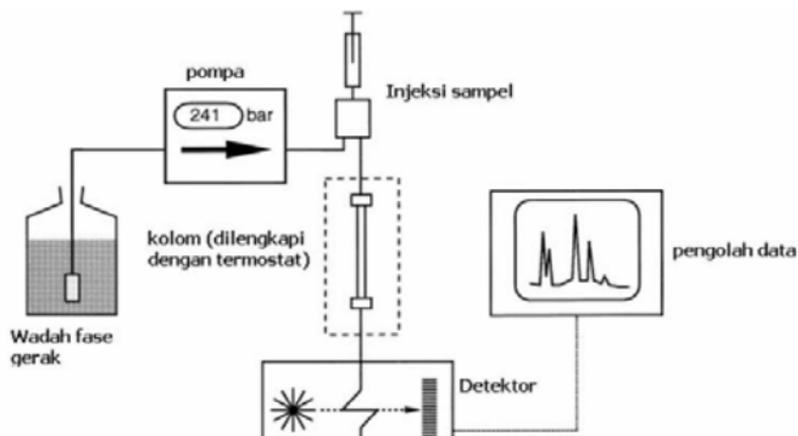
F. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Kromatografi cair kinerja tinggi adalah alat pemisahan hasil partisi, adsorpsi, atau penukar ion, tergantung jenis fase diam yang digunakan. KCKT dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif secara bersamaan. Sistem pompa tekanan tinggi diperlukan untuk mengalirkan fase gerak pada tekanan tinggi hingga 300 atmosfer. Identifikasi KCKT memerlukan fase gerak berkualitas tinggi dan belum dipakai, kandungan gas di dalamnya harus dihilangkan. Kinerja kromatografi dan resolusi senyawa dalam campuran bahan uji dipengaruhi jenis dan komposisi fase gerak. Komposisi pelarut dapat diubah secara berkesinambungan yang biasa disebut dengan eluasi gradien atau pengaturan pelarut.

Berikut prosedur kerja kromatografi cair kinerja tinggi :

- a. Bahan uji harus bebas partikel sebelum diinjeksikan ke dalam KCKT.
- b. Kromatogram ditandai dengan adanya berupa puncak-puncak yang timbul dalam waktu retensi (t_r) masing-masing komponen berbeda., kemudian dibandingkan dengan waktu retensi bahan pembanding.

- c. Penentuan kuantitatif dilakukan dengan penggunaan pembanding internal yang ditambahkan ke dalam larutan uji dan larutan pembanding.



Gambar. 5.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



BAB VI FORMULASI KOMBINASI BAHAN ALAM TERHADAP MIKROBA PENYEBAB INFEKSI

A. FORMULASI KOMBINASI BAHAN ALAM

Formulasi merupakan penyatuan komponen-komponen, sedangkan kombinasi merupakan penggabungan beberapa obyek salah satunya seperti tanaman. Formulasi kombinasi merupakan penggabungan dari beberapa komponen yang menjadi satu kesatuan, seperti penggabungan beberapa tanaman yang memiliki efek sinergi yang saling melengkapi dan meningkatkan suatu khasiat dari kombinasi tanaman (Halimatussa'diah, dkk, 2014).

Formulasi kombinasi merupakan gabungan dua kata yaitu formulasi dan kombinasi, formulasi adalah senyawa

kimia yang terkandung dalam suatu bahan yang digunakan sesuai dengan ukuran yang tepat, sedangkan kombinasi merupakan penggabungan antara satu senyawa dengan senyawa lainnya (KKBI). Formulasi yaitu jumlah kandungan kimia yang terdapat di dalam satu bahan yang telah diketahui jumlahnya, Sedangkan kombinasi merupakan penggabungan anatara satu bahan dengan bahan lainnya yang menjadikan satu kesatuan (Army, 2013). Formulasi merupakan gabungan satu bahan dengan bahan lainnya yang telah di ketahui senyawa kimia yang terkandung didalamnya serta ukurannya, kombinasi yaitu penggabungan dua bahan atau lebih yang tercampur menjadi satu (Rika, 2015).

Berdasarkan dari pengertian di atas dapat disimpulkan bahwa formulasi kombinasi bioherbal yaitu gabungan bahan alam antara satu bahan dengan bahan lainnya yang mempunyai khasiat tertentu dan yang digunakan hanya bagian-bagian alam (tumbuhan) contohnya daun, batang dan akar

Pengobatan secara tradisional umumnya menggunakan bahan alam berupa tanaman berkhasiat obat yang diperuntukkan pada penyakit tertentu. Pemanfaatan tanaman secara tradisional umumnya dikenal dengan

istilah bioherbal. Bioherbal adalah bahan alam yang pada umumnya dilengkapi dengan kandungan obat atau kandungan fitokimia dimana setiap bagian-bagian dari tanaman seperti akar, batang dan daun tersebut memiliki kandungan fitokimia yang berbeda-beda (Latifah, 2019).

Pengobatan tradisional umumnya meramu atau menggunakan satu atau lebih tanaman sebagai bahan obat. Penggunaan tanaman sebagai bahan baku obat sudah ada sejak manusia pandai meramu yang kemudian menjadi warisan dari nenek moyang sampai dengan masyarakat sekarang. Salah satunya adalah masyarakat suku Dayak yang memanfaatkan tanaman disekitarnya sebagai bahan yang digunakan dalam pengobatan. Tanaman tersebut diramu atau dikombinasikan dengan berbagai macam tanaman lainnya dengan komposisi yang telah dilakukan secara turun-temurun dari orang-orang terdahulu, oleh sebab itu perlu adanya formulasi kombinasi bioherbal yang pasti dalam menggabungkan bahan-bahan tanaman tersebut, agar manfaat dari ramuan atau kombinasi tersebut dapat lebih maksimal (Meliki, 2013).

B. SENYAWA METABOLIT SEKUNDER

Senyawa metabolit sekunder merupakan kandungan zat yang terdapat dalam bahan alam, yang dapat diperoleh

meralui proses ekstraksi. Ekstraksi merupakan suatu metode yang digunakan dalam proses pemisahan kimia untuk memisahkan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan sejumlah pelarut tertentu yang sesuai sebagai pemisah (Aprillah, 2016; 13). Ekstraksi memiliki tujuan yaitu untuk menarik atau memisahkan senyawa dari campurannya atau disebut simplisia. Umumnya ekstraksi akan semakin baik apabila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan pelarut semakin luas. Dengan demikian, semakin halus serbuk simplisia maka akan semakin baik simplisianya (Febriana dan Oktavia, 2019: 13). Terdapat berbagai cara dalam melakukan ekstraksi, diketahui masing-masing cara memiliki kelebihan dan kekurangannya. Teknik memilih metode dilakukan dengan memperhatikan seperti sifat senyawa, pelarut yang digunakan, dan alat yang tersedia. Struktur untuk setiap senyawa, suhu dan tekanan adalah faktor yang perlu diperhatikan dalam melakukan ekstraksi (Hanan, 2015: 10).

Ekstrak merupakan sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Ada beberapa syarat agar pelarut dapat digunakan dalam

proses ekstraksi, yaitu pelarut tersebut merupakan pelarut yang terbaik untuk tanaman yang akan diekstraksi dan bahan pelarut harus dapat terpisah dengan cepat setelah pengocokkan. Dalam memilih bahan pelarut yang harus diperhatikan antara lain toksisitas, ketersediaan, harga, sifat tidak mudah terbakar, rendahnya suhu kritis dan tekanan kritis.

Menurut Wahyuni dan Waluyo (2015) beberapa macam pelarut yang umumnya digunakan dalam proses ekstraksi, yaitu:

1) Metanol

Metanol merupakan suatu senyawa yang struktur molekul CH_3OH , bersifat polar karena memiliki gugus hidroksil (-OH) dan juga bersifat non-polar karna memiliki gugus metil (- CH_3). Walaupun demikian, metanol merupakan senyawa bersifat polar (Ramdani, dkk, 2017).

2) n-Heksana

Heksana merupakan senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} . Pelarut n-herksana bersifat non-polar memiliki kemampuan untuk mengikat gugus nonpolar (OH) yang ada pada zat warna flavonoid dan tanin. Umumnya senyawa ini

merupakan cairan tak berwarna yang tidak larut dalam air.

3) Etil asetat

Etil asetat merupakan sebagai pelarut semi polar tidak mampu menarik senyawa yang terlalu polar maupun non-polar, namun pelarut ini baik digunakan untuk ekstraksi karena dapat dengan mudah diuapkan, tidak hidroskopis, dan memiliki toksisitas yang rendah. Etil asetat merupakan cairan tidak berwarna, transparan, bau harum, segar dan sedikit seperti aseton. Etil asetat dapat bercampur dengan eter, alkohol dan minyak atiri dan minyak lemak.

a. **Tambora**

1) Klasifikasi Tumbuhan Tambora

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Asterales
Famili	: Asteraceae
Genus	: <i>Ageratum</i>
Spesies	: <i>Ageratum conyzoides</i>

2) Morfologi Tumbuhan Tambora



Gambar 6.1 Morfologi Tambora

(Gea, H. A. 2018)

Tanaman tambora merupakan tanaman gulma dari golongan semusim mempunyai penyebaran yang cukup luas, suhu optimal untuk tumbuhnya berkisar 16° - 24° C. Tanaman tambora memiliki batang tegak mencapai ketinggian 30-60 cm, batang tegak, bulat bercabang berambut pada buku-bukunya. Daunnya bertangkai, berbentuk bulat telur, tepi bergerigi dan berambut, tata letak daun berhadapan. Bunga berwarna putih atau ungu dan memiliki akar tunggang (Amir, M. R., 2019).

3) Senyawa Metabolit dalam Daun Tambora

Tanaman Tambora mengandung senyawa metabolit seperti asam amino, organacid, pectic substance, minyak astiri kumarin, ageratochromene, friedelin, β -sitosterol, flavonoid, saponin, stigmasterol, tannin, sulfur, dan potasium chlorida, minyak astiri, alkaloid, dan kumarin. Kandungan senyawa aktif yang ada pada daun tambora diketahui mengandung metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, kromen, kromon, benzofuran, kumarin, minyak astiri, sterol, dan tannin (Amin, M. R., 2019).

b. Sembalit Angin

1) Klasifikasi Tumbuhan Sembalit Angin

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Rubiales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: <i>Mussaenda</i>
Spesies	: <i>Mussaenda frondosa</i>

2) Morfologi Tumbuhan Sembalit Angin



Gambar 6.2 Morfologi Sembalit Angin

(Gea, H. A. 2018)

Tanaman Sembalit Angin termasuk anggota famili Rubiaceae, tanaman perdu dengan tinggi mencapai 2 m dan percabangan simpodial, memiliki bentuk batang bulat. Daun tunggal, berbentuk bulat telur, memiliki pertulangan daun menyirip, tepi bergelombang, ujung daun meruncing dan pangkal daun berbentuk petiolatus. Memiliki daun berwarna hijau dan pada pucuknya terdapat daun yang tampak seperti bunga berwarna putih. Bunga pada tanaman Sembalit Angin merupakan bunga majemuk terletak di terminal, dengan karangan bunga kapitulium, simetri bunga aktinomorf. Bunga berbentuk terompet berwarna oranye (Garvita, 2017).

- 3) Senyawa Metabolit dalam Daun Sembalit Angin
Tanaman Sembalit Angin memiliki kandungan senyawa kimia seperti alkaloid, saponin, glikosida, flavonoid, dan tannin (Garvita, 2017).

c. Kunyit

- 1) Klasifikasi Tumbuhan Kunyit

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermtophyta
Class	: Monocotyledoneae
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: <i>Curcuma</i>
Spesies	: <i>Curcuma longa</i>

- 2) Morfologi Tumbuhan Kunyit



Gambar 6.3 Morfologi Kunyit

(Cahyani: 2019)

Tanaman kunyit memiliki batang semu yang tersusun dari kelopak atau pelepah daun yang saling menutupi, bersifat basah dan mampu menyimpan air dengan baik, berbentuk bulat, berwarna hijau keunguan, dan tingginya mencapai 0,75 m. Daun kunyit terdiri dari pelepah daun, gagang daun, dan helai daun. Daun tersusun secara berselang-seling, panjang helai antara 31-84 cm, lebar daun antara 10-18 cm. Berbentuk bulat telur memanjang dengan permukaan agak kasar, pertulangan daun rata dan ujung meruncing, dan berwarna hijau muda. Bunga berbentuk kerucut runcing berwarna putih atau kuning muda dan pangkal berwarna putih.

Rimpang kunyit tersusun atas cabang-cabang membentuk rumpun, terdiri atas rimpang induk atau umbi kunyit dan tunas atau cabang rimpang. Rimpang kunyit tumbuh dari umbi kunyit yang berbentuk bulat panjang. Warna kulit rimpang kunyit berwarna jingga kecoklatan atau terang agak kekuningan sampai kuning kehitaman dan warna daging rimpangnya jingga kekuningan (Sani, dkk., 2019)

3) Senyawa Metabolit dalam Rimpang Kunyit

Kandungan senyawa kimia yang ada pada kunyit antara lain adalah minyak astiri yang terdiri dari alpha dan beta tumerone, aril-tumeron, artumerone, alpha dan beta atlantone, kurlon kurkumol, zingiberen, bisabolen, seskuifellandren, aril kurkumen, humulen. Kukuminoid terdiri dari kurkumin, dimetoksi kurkuin, desmetoksirkurkumin, bisdemetoksi kurkumin, dihidrokurkumin, natrium kurkuminat (NaC), diasetil kurkumin (DAC), trietil kurkumin (TEC), tetra hidro kurkumin (THC), asam ferulat (FA). Arbinosa, fruktosa, pati, tanin, dan damar (Sani, dkk., 2019).

Kunyit memiliki beberapa kandungan senyawa kimia didalamnya yaitu minyak atsiri 4,2-14%, minyak lemak 4,4-12,7%, dan senyawa kurkuminoid. Kurkumin banyak memiliki manfaat, diantaranya sebagai anti peradangan, antioksidan, dan antiprotozoa. Minyak curcuma yang terkandung di dalam kunyit juga bisa sebagai antibakteri (Simanjuntak, 2015).

C. POTENSI KOMBINASI DAUN TAMBORA, DAUN SEMBALIT ANGIN, RIMPANG KUNYIT SEBAGAI ANTIBAKTERI PENYEBAB INFEKSI POST PARTUM

1. *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* menurut Nurhayati (2019) adalah sebagai berikut :

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

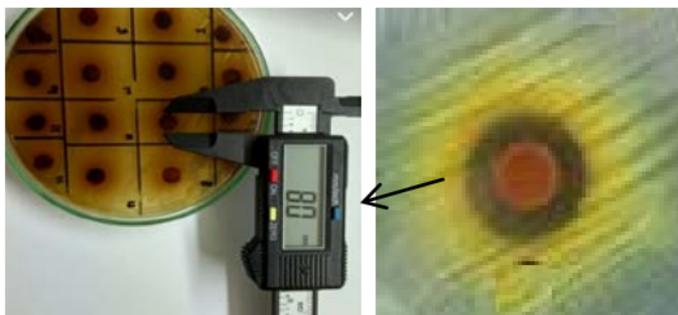
Bakteri *Staphylococcus aureus* termasuk bakteri Gram positif. *Staphylococcus aureus* memiliki bentuk bulat dan rangkaiannya seperti anggur. *Staphylococcus aureus* memiliki koloni yang biasanya berwarna kuning, merah, atau jingga. *Staphylococcus aureus* tidak memiliki spora karena tidak membentuk spora dan tidak dapat bergerak (Nurhayati, 2019: 4). *Staphylococcus aureus* memiliki diameter berukuran 0,8-1,0 mikron.

Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* hampir serupa dengan layaknya pertumbuhan flora normal lainnya. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang termasuk flora normal, terutama pada kulit dan selaput lendir pada manusia. *Staphylococcus aureus* memiliki suhu optimum 35°C. Batas suhu pertumbuhannya antara 15°C dan 40°C. Suasana aerob sangat baik untuk pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh pada udara yang hanya mengandung hidrogen dan pH optimum 7,4 sebagai pertumbuhan. *Staphylococcus aureus* bersifat anaerob fakultatif. Koloni *Staphylococcus aureus* yang masih muda tidak memiliki warna, namun pertumbuhannya terbentuk pigmen yang dapat larut dalam alkohol, eter, khloroform, dan benzol.

Staphylococcus aureus termasuk flora normal yang ada pada kulit, saluran pernapasan dan saluran pencernaan makanan pada manusia. *Staphylococcus aureus* memiliki sifat invasif, bisa menyebabkan hemolisis, membentuk koagulasi, mencairkan gelatin, dan meragi manitol. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan penyakit karena memiliki kemampuan untuk berkembangbiak dan menyebar luas dalam jaringan dan melalui pembentukan zat ekstraseluler. Selama *Staphylococcus aureus* terus

meningkat dalam jaringan, leukosit juga akan meningkat untuk membunuh bakteri tersebut. (Agestin, 2019).

Potensi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit sebagai antibakteri penyebab infeksi post partum dilakukan berdasarkan perlakuan ekstrak kombinasi terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro. Pengukuran pertumbuhan *Staphylococcus aureus* berdasarkan hasil pengukuran diameter zona bening antara ekstrak dengan sisi terluar zona bening, di mana zona bening merupakan parameter daya hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in vitro, sebagaimana disajikan pada Gambar 6.4.



Gambar 6.4 Pengukuran Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

Formulasi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit disusun dalam 4 kombinasi, yaitu 3:2:1, 2:3:1, 1:2:3, dan 2:1:3. Konsentrasi ekstrak dirancang dari 30%, 40%, 50%, 60%, dan 80%. Potensi formulasi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro (Tabel 6.1).

Tabel 6.1 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 3:2:1

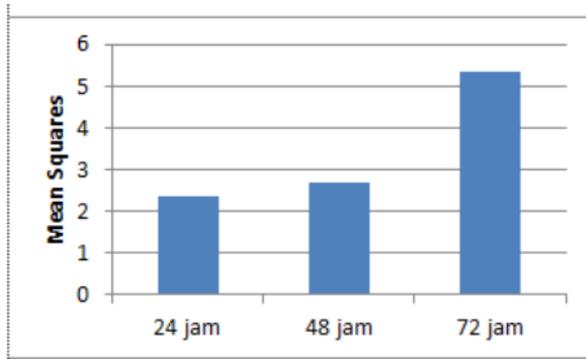
Perlakuan Kombinasi Ekstrak 3:2:1	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	0,96	1,11	0,62
Aquades (-)	0	0	0
30%	2,56	2,59	3,26
40%	1,72	2,58	3,09
50%	0,70	1,03	1,01
60%	0,71	1,15	0,99
70%	0,88	1,32	1,58
80%	0,81	1,01	1,04

Keseluruhan data pada formulasi kombinasi 3:2:1 dianalisis statistik Anava satu jalur dan dilanjutkan uji Duncan 1% untuk mengetahui konsentrasi optimal dan efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Tabel 6.2 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 3:2:1

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	16,572	,000	20,719	,000	37,297	,000
Within Groups	2,801		4,179		8,039	
Total	19,373		24,897		45,335	

Data hasil analisis statistik ANAVA di atas didukung dengan dengan perbandingan *mean square* dalam bentuk diagram pada Gambar 6.5.



Gambar 6.5 Mean Square Formula Kombinasi 3:2:1 (*Staphylococcus aureus*)

Data rekapitulasi pada Tabel 6.2 diketahui bahwa hasil analisis variansi perlakuan ekstrak kombinasi daun

Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada signifikansi 1%, pada waktu perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Diagram perbandingan *mean square* mempertegas signifikansi pengaruh formulasi 3:2:1, dimana masa inkubasi 72jam memiliki nilai *mean square* lebih besar. Konsentrasi optimal dan efektif ekstrak, dijelaskan pada Tabel 6.3, Tabel 6.4, dan Tabel 6.5.

Tabel 6.3 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 3:2:1 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi 3:2:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
P2	4	a			
P5	4		b		
P6	4		b		
P8	4		b		
P7	4		b		
P1	4		b		
P4	4			c	
P3	4				d
Sig.		1,000	,346	1,000	1,000

Berdasarkan hasil dari uji Duncan 1%, formulasi kombinasi P5, P6, P7, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), dalam arti bahwa pada konsentrasi tsb memiliki kemampuan yang sama dengan

Chloramfenicol 0.1%. Tetapi konsentrasi tersebut berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan P4 atau konsentrasi 40%, dan P3 (30%). Dengan demikian, konsentrasi 30% dapat disimpulkan sebagai konsentrasi yang efektif dan optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada formulasi kombinasi 3:2:1 masa inkubasi 24 jam.

Tabel 6.4 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 3:2:1 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 3:2:1	Notasi Subset for alpha = 0.01			
	N	1	2	3
P2	4	a		
P8	4		b	
P5	4		b	
P1	4		b	
P6	4		b	
P7	4		b	
P4	4			c
P3	4			c
Sig.		1,000	,357	,960

Hasil dari uji Duncan 1%, bahwa perlakuan P5, P6, P7, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), dalam arti bahwa pada konsentrasi tsb tetap memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol*

0.1%. Masa inkubasi 48 jam memiliki daya hambat yang hampir sama dengan 24 jam, dimana konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif dan optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada formulasi kombinasi 3:2:1 masa inkubasi 48 jam.

Tabel 6.5 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 3:2:1 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 3:2:1	Notasi Subset for alpha = 0.01			
	N	1	2	3
P2	4	a		
P1	4	a	b	
P6	4	a	b	
P5	4	a	b	
P8	4	a	b	
P7	4		b	
P4	4			c
P3	4			c
Sig.		1,000	,357	,960

Perlakuan penelitian P5, P6, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1) dan juga kontrol positif pada masa inkubasi 72 jam. Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.5 menunjukkan interpretasi data bahwa pada konsentrasi tsb tetap memiliki kemampuan yang sama. Meskipun demikian, masa inkubasi 24 jam,

48 jam, dan 72 jam memberikan fakta ilmiah bahwa konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif dan optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada formulasi kombinasi 3:2:1.

Formulasi kombinasi 2:3:1 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro (Tabel 6.6).

Tabel 6.6 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 2:3:1

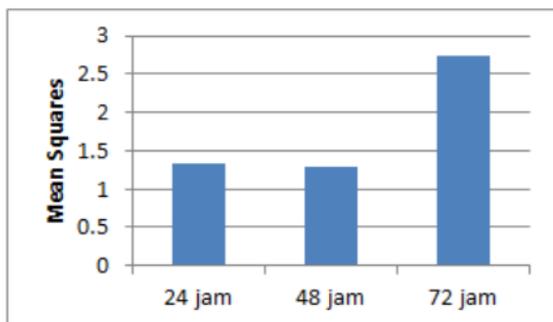
Perlakuan Kombinasi Ekstrak 2:3:1	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	0,67	0,89	0,49
Aquades (-)	0	0	0
30%	1,51	1,72	1,89
40%	1,45	1,55	2,54
50%	0,61	0,81	1,08
60%	0,78	0,81	0,95
70%	1,72	1,58	1,83
80%	0,71	0,88	0,86

Hasil analisis data formulasi kombinasi 2:3:1 dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* disajikan pada Tabel 6.7.

Tabel 6.7 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 2:3:1

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	9,374	,000	8,956	,000	19,159	,000
Within Groups	2,030		2,456		3,221	
Total	11,404		11,412		22,380	

Data hasil analisis statistik ANAVA di atas didukung dengan dengan perbandingan *mean square* dalam bentuk diagram pada Gambar 6.6.



Gambar 6.6 Mean Square Formula Kombinasi 2:3:1 (*Staphylococcus aureus*)

Data rekapitulasi pada Tabel 6.6 diketahui bahwa hasil analisis variansi perlakuan ekstrak kombinasi daun

Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada signifikansi 1%, pada waktu perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Gambar 6.6 disajikan dalam bentuk diagram perbandingan *mean square* mempertegas signifikansi bahwa nilai *means square* untuk formulasi 2:3:1 masa inkubasi 72 jam lebih besar. Konsentrasi optimal dan efektif ekstrak, pada Tabel 6.8, Tabel 6.9, dan Tabel 6.10.

Tabel 6.8 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 2:3:1 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi 2:3:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P5	4		b	
P1	4		b	
P8	4		b	
P6	4		b	
P4	4			c
P3	4			c
P7	4			c
Sig.		1,000	,459	,231

Hasil dari uji Duncan 1% pada Tabel 6.8 diinterpretasikan bahwa perlakuan P5, P6, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang

sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Tetapi konsentrasi tersebut berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan P3 (30%), P4 (40%), dan P7 (70%). Konsentrasi 30% dapat disimpulkan sebagai konsentrasi yang efektif, sedangkan konsentrasi 70% sebagai konsentrasi optimum untuk formulasi 2:3:1 dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* masa inkubasi 24 jam.

Tabel 6.9 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 2:3:1 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 2:3:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P5	4		b	
P6	4		b	
P8	4		b	
P1	4		b	
P4	4			c
P7	4			c
P3	4			c
Sig.		1,000	,750	,499

Pengaruh perlakuan pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam memiliki interpretasi yang hampir sama, di mana hasil uji Duncan 1% (Tabel 6.9) menunjukkan perlakuan P5, P6, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga penafsiran perbandingan terhadap daya bunuh senyawa metabolit sekunder pada formulasi

2:3:1 yang dimiliki konsentrasi tsb dapat dianggap setara dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Pada waktu inkubasi 24 jam juga menampilkan bahwa konsentrasi tersebut berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan P3 (30%), P4 (40%), dan P7 (70%). Demikian pula dengan konsentrasi efektif dan optimum yang tidak berbeda dengan 24 jam.

Tabel 6.10 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 2:3:1 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 2:3:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4	a	b	
P8	4		b	
P6	4		b	
P5	4		b	
P7	4			c
P3	4			c
P4	4			c
Sig.		,069	,048	,016

Pengamatan pada masa inkubasi 72 jam (Tabel 6.10) kontrol positif berupa *Chloramfenicol* 0.1% (P1) mengalami penurunan daya bunuh yang sangat signifikan, dibuktikan dengan notasi yang tidak berbeda dibandingkan kontrol negatif penelitian (P2). Demikian

pula dengan konsentrasi yang lebih besar seperti P5, P6, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1). Hal ini diduga disebabkan penyerapan ekstrak dengan konsentrasi lebih pekat tidak maksimal dibandingkan konsentrasi yang lebih rendah. Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.10 menunjukkan data empirik bahwa konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada formulasi kombinasi 2:3:1.

Konsentrasi efektif dan optimum penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* formulasi kombinasi 3:2:1 dan 2:3:1 hampir sama, di mana komposisi daun Tambora dan daun Sembalit Angin memiliki bahan utama campuran. Hal ini memberikan gambaran potensi bahan alam tersebut yang dapat dipahami memiliki potensi yang hampir setara dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Selanjutnya, untuk formulasi kombinasi 1:2:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro disajikan pada Tabel 6.11. Tujuan variasi formulasi dalam penelitian ini bertujuan untuk mencari formulasi senyawa metabolit sekunder yang tepat dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri penyebab infeksi post partum, *Staphylococcus aureus* secara in vitro. Penghambatan pertumbuhan secara in vitro ditandai dengan adanya zona bening antara sisi terluar paper disc

yang mengandung ekstrak dengan koloni terjauh yang berhasil tumbuh di permukaan medium pertumbuhan.

Tabel 6.11 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 1:2:3

Perlakuan Kombinasi Ekstrak 1:2:3	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	0,82	0,75	0,57
Aquades (-)	0	0	0
30%	0,73	1	1,52
40%	0,91	0,79	1,45
50%	0,67	0,60	0,69
60%	0,54	0,51	0,85
70%	0,97	1,06	1,64
80%	0,65	0,61	1,11

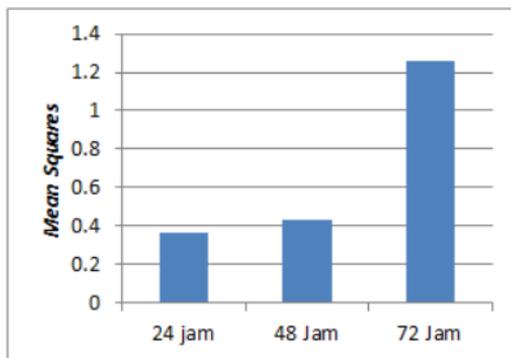
Data formulasi kombinasi 1:2:3 dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada Tabel 6:11 selanjutnya dilanjutkan dengan analisis varians, dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan penelitian. Formulasi kombinasi 1:2:3 menekankan pada kombinasi rimpang kunyit sebagai komponen kombinasi yang paling dominan, yang nantinya akan diketahui perbandingan respon daya hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus*

aureus yang lebih baik. Data hasil analisis varians satu jalur disajikan pada Tabel 6.12.

Tabel 6.12 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 1:2:3

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	2,537	,000	3,036	,000	8,821	,000
Within Groups	0,898		1,160		7,740	
Total	3,435		4,195		16,561	

Nilai *mean square* dalam bentuk diagram pada Gambar 6.7 memperkuat data hasil analisis pada Tabel 6.12.



Gambar 6.7 Mean Square Formula Kombinasi 1:2:3 (*Staphylococcus aureus*)

Formulasi kombinasi ekstrak 1:2:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada signifikansi 1%, pada waktu perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam (Tabel 6.12). Signifikansi dipertegas dengan perbandingan *mean square* bahwa inkubasi 72 jam lebih besar (Gambar 6.7). Data uji lanjut Duncan selanjutnya disajikan pada Tabel 6.13, Tabel 6.14, dan Tabel 6.15.

Tabel 6.13 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 1:2:3 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P6	4		b	
P8	4		b	c
P5	4		b	c
P3	4		b	c
P1	4		b	c
P4	4		b	c
P7	4			c
Sig.		1,000	,024	,046

Perlakuan konsentrasi ekstrak pada formulasi kombinasi 1:2:3 memiliki daya hambat yang hampir sama antar masing-masing konsentrasi. Hasil dari uji Duncan

1% Tabel 6.13 menunjukkan perlakuan P3, P4, P5, P6, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Tetapi konsentrasi 60% (P6) berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan P7 (70%). Hal ini menunjukkan konsentrasi 70% sebagai konsentrasi yang lebih baik dibandingkan konsentrasi yang lebih tinggi (80%) dan lebih rendah lainnya. Oleh karena tidak terdapat perbedaan signifikan antara konsentrasi 70% (P7) dibandingkan dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, dan 80%, maka konsentrasi 30% dapat dinyatakan konsentrasi yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* masa inkubasi 24 jam. Karena konsentrasi minimal 30% tidak berbeda secara statistik dengan konsentrasi 70%, sedangkan konsentrasi 70% diinterpretasikan sebagai konsentrasi optimum untuk formulasi 1:2:3 dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* masa inkubasi 24 jam.

Efektifitas senyawa metabolit sekunder dalam formulasi kombinasi 1:2:3 selanjutnya dilakukan pengamatan pada masa inkubasi 48 jam dan 72 jam. Pengamatan ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan daya bunuh senyawa metabolit sekunder dalam bahan alam.

Tabel 6.14 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 1:2:3 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P6	4		b	
P5	4		b	c
P8	4		b	c
P1	4		b	c
P4	4		b	c
P3	4			c
P7	4			c
Sig.		1,000	,122	,015

Pengaruh perlakuan pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam pun memiliki interpretasi yang hampir sama. Hasil uji Duncan 1% (Tabel 6.14) menunjukkan perlakuan perlakuan P4, P5, P6, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Konsentrasi 60% (P6) berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan P3 (30%) dan P7 (70%). Konsentrasi 30% dinyatakan konsentrasi yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* masa inkubasi 48 jam.

Tabel 6.15 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 1:2:3 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.0	
		1	2
P2	4	a	
P1	4	a	b
P5	4	a	b
P6	4	a	b
P8	4	a	b
P4	4		b
P3	4		b
P7	4		b
Sig.		,019	,027

Masa inkubasi 72 jam (Tabel 6.15) kontrol positif berupa *Chloramfenicol* 0.1% (P1) mengalami penurunan daya bunuh yang sangat signifikan, dibuktikan dengan notasi yang tidak berbeda dibandingkan kontrol negatif penelitian (P2). Demikian pula dengan konsentrasi yang lebih besar seperti P5, P6, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1). Sebagaimana pada formulasi kombinasi 3:2:1 konsentrasi lebih pekat mempunyai daya hambat yang tidak lebih baik dibandingkan konsentrasi yang lebih rendah. Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.15 juga menunjukkan data empirik bahwa konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif dan konsentrasi 70% sebagai konsentrasi optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada formulasi kombinasi 1:2:3.

Formulasi kombinasi 2:1:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro disajikan pada Tabel 6.16.

Tabel 6.16 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 2:1:3

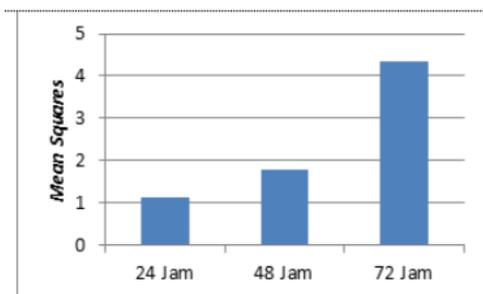
Perlakuan Kombinasi Ekstrak 2:1:3	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	1,25	1,33	0,47
Aquades (-)	0	0	0
30%	1,71	2,37	3,17
40%	1,18	1,35	2,06
50%	1,21	1,27	0,66
60%	1,21	1,54	0,66
70%	1,70	1,77	1,26
80%	1,28	1,12	1,88

Data formulasi kombinasi 1:2:3 dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada Tabel 6:11 selanjutnya sebagaimana data perlakuan kombinasi lainnya dilanjutkan dengan analisis varians, dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan penelitian. Data hasil analisis varians satu jalur disajikan pada Tabel 6.17.

Tabel 6.17 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 2:1:3

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	7,815	,007	12,448	,001	30,408	,000
Within Groups	7,229		7,392		9,758	
Total	15,044		19,880		40,166	

Berdasarkan rekapitulasi hasil analisis statistik menunjukkan formulasi kombinasi 2:1:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit berpengaruh signifikan, dibuktikan dengan nilai Sig. $0.007 < 0.01$ (24 jam), Sig. $0.001 < 0.001$ (48 jam), dan Sig. $0.000 < 0.01$ (72 jam).



Gambar 6.8 Mean Square Formula Kombinasi 2:1:3 (*Staphylococcus aureus*)

Signifikansi formulasi kombinasi ekstrak 2:1:3 dipertegas dengan perbandingan *mean square*. Perbandingan *mean square* memberikan fakta masa inkubasi 72 jam memiliki perbedaan capaian optimalisasi pengaruh variabel yang lebih kuat dibandingkan 24 jam dan 48 jam, sehingga hasilnya dapat dijadikan barometer penentuan konsentrasi yang paling efektif dalam formulasi. Uji statistik Duncan 1% memberikan perbedaan pengaruh variabel independen antar taraf perlakuan terhadap variabel dependen penelitian secara statistik, sehingga dapat mengetahui efektifitas dan optimalitas perlakuan. Uraian hasil uji Duncan disajikan Tabel 6.18, Tabel 6.19, dan Tabel 6.20.

Tabel 6.18 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 2:1:3 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi 2:1:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01	
		1	2
P2	4	a	
P4	4		b
P5	4		b
P6	4		b
P1	4		b
P8	4		b
P7	4		b
P3	4		b
Sig.		1,000	,244

Perlakuan konsentrasi ekstrak pada formulasi kombinasi 2:1:3 memiliki daya hambat yang sama antar seluruh taraf konsentrasi dan tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Konsentrasi efektif pada formulasi ini berada pada konsentrasi 30% sedangkan konsentrasi 80% diinterpretasikan sebagai konsentrasi optimum untuk formulasi 2:1:3 dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* masa inkubasi 24 jam. Pengamatan pada masa inkubasi 48 jam disajikan pada Tabel 6.19.

Tabel 6.19 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 2:1:3 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 2:1:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P8	4		b	
P5	4		b	c
P1	4		b	c
P4	4		b	c
P6	4		b	c
P7	4		b	c
P3	4			c
Sig.		1,000	,161	,019

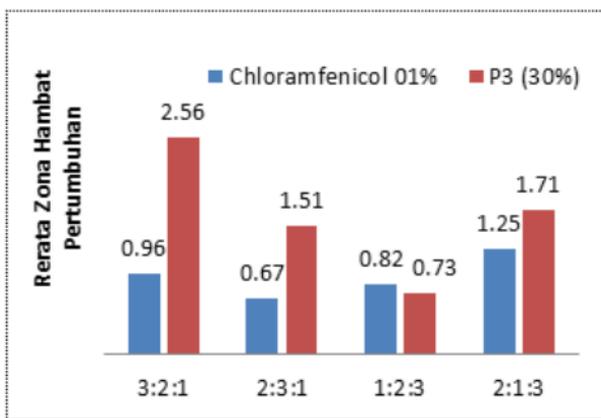
Pengaruh perlakuan pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam pun memiliki interpretasi yang hampir sama. Hasil uji Duncan 1% (Tabel 6.19) menunjukkan antar seluruh taraf konsentrasi dan tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Akan tetapi konsentrasi 80% (P8) berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan P3 (30%). Konsentrasi 30% dinyatakan konsentrasi yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* masa inkubasi 48 jam, dan konsentrasi

Tabel 6.20 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Kombinasi 2:1:3 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 2:1:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.0			
		1	2	3	4
P2	4	a			
P1	4	a			
P5	4	a	b		
P6	4	a	b		
P7	4	a	b	c	
P8	4		b	c	d
P4	4			c	d
P3	4				d
Sig.		,018	,019	,104	,011

Sebagaimana formulasi kombinasi 1:2:3, masa inkubasi 72 jam kontrol positif berupa *Chloramfenicol* 0.1% (P1) untuk formulasi 2:3:1 juga mengalami penurunan daya bunuh yang sangat signifikan, dibuktikan dengan notasi yang tidak berbeda dibandingkan kontrol negatif penelitian (P2). Demikian pula dengan konsentrasi yang lebih besar seperti P5, P6, dan P7 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1). Konsentrasi yang lebih pekat pada formulasi 2:1:3 juga mempunyai daya hambat yang tidak lebih baik dibandingkan konsentrasi yang lebih rendah, sebagaimana pada formulasi yang lain. Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.20 juga menunjukkan data empirik bahwa konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif dan konsentrasi optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada formulasi kombinasi 2:1:3.

Secara keseluruhan formulasi kombinasi ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan pada taraf signifikansi 1% terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Perbandingan efektifitas daya bunuh pada masing-masing formulasi kombinasi dapat diketahui dengan membandingkan potensi formulasi kombinasi secara statistik. Perbandingan potensi formulasi kombinasi ekstrak yang paling potensial dan dapat dijadikan sebagai rekomendasi informasi untuk memperkuat fakta etnobotani sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus* salah satu penyebab infeksi post partum disajikan pada Gambar 6.9.



Gambar 6.9 Perbandingan Kemampuan Penghambatan Pertumbuhan Konsentrasi Ekstrak Efektif Formulasi Kombinasi dengan Kontrol Positif Terhadap *Staphylococcus aureus*

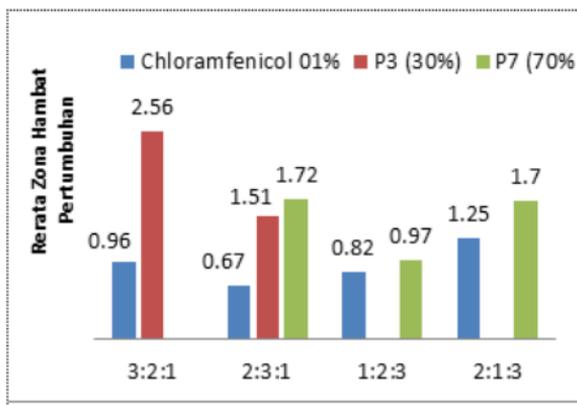
Gambar 6.9 memberikan ilustrasi perbandingan daya hambat efektif dari masing-masing formulasi kombinasi ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit. Jika dilihat dari perbandingan konsentrasi efektif dari masing-masing formulasi, maka formulasi 3:2:1 merupakan formula terbaik, dengan daya hambat terbesar dibandingkan dengan formulasi lainnya. Formulasi 3:2:1 memiliki kombinasi daun Tambora lebih besar, yaitu 50% dari komposisi seluruhnya. Fakta ini mampu membuktikan potensi daun Tambora sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus* dalam masa inkubasi 24 jam. Demikian pula jika dibandingkan dengan kontrol positif, maka potensi kombinasi 3:2:1 memiliki perbedaan

zona hambat yang sangat signifikan dibandingkan antibakteri *Cholamfenicol* 0.1%.

Antibakteri dominan dalam daun Tambora lebih kuat dibandingkan dengan kandungan yang terdapat dalam rimpang Kunyit, jika dilihat dari perbandingan zona hambat dari formulasi 3:2:1 dan formulasi 2:1:3, di mana formulasi 2:1:3 menjadikan kunyit sebagai komposisi utamanya. Formulasi 2:3:1 memiliki komposisi utamanya daun Sembalit Angin, jika dilihat dari zona hambat yang terbentuk, maka formulasi ini lebih baik dibandingkan dengan formulasi 1:2:3 yang memiliki kandungan daun Tambora lebih rendah. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa formulasi kombinasi ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang terbaik adalah formulasi kombinasi 3:2:1.

Formulasi kombinasi 3:2:1 mengkombinasikan potensi daun Tambora sebagai komposisi utama, yaitu 50% daun Tambora, 30% daun Sembalit Angin, dan 20% rimpang Kunyit. Indikator zona bening yang terbentuk antara sisi terluar paper disc yang mengandung ekstrak memiliki kemampuan daya hambat paling efektif pada konsentrasi 30%. Konsentrasi ini merupakan konsentrasi paling rendah dalam rentang perlakuan penelitian, tetapi memiliki daya hambat yang berbeda signifikan dibandingkan kontrol positif (*Cholamfenicol* 0.1%). Hal ini membuktikan potensinya sebagai antibakteri.

Efektifitas daya hambat formulasi kombinasi 3:2:1 ekstrak diperkuat dengan perbandingan konsentrasi optimum ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (Gambar 6.10).



Gambar 6.10 Perbandingan Kemampuan Penghambatan Pertumbuhan Konsentrasi Ekstrak Optimum Formulasi Kombinasi dengan Kontrol Positif Terhadap *Staphylococcus aureus*

Perbandingan dari masing-masing formulasi kombinasi yang ditunjukkan Gambar 6.10 memperkuat potensi formulasi kombinasi 3:2:1. Daya hambat optimum yang memiliki zona hambat terbesar dengan konsentrasi terendah ada pada formulasi kombinasi 3:2:1. Data ini memberi interpretasi bahwa dengan konsentrasi 30% formulasi kombinasi 3:2:1 memiliki daya hambat

pertumbuhan lebih kuat dibandingkan dengan formulasi lainnya, di mana formulasi 2:3:1, 1:2:3, dan 2:1:3 memiliki daya hambat optimum pada konsentrasi 70%.

2. *Escherichia coli*

Klasifikasi *Escherichia coli* menurut (Lusiana (2018)) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Eubacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaprobia
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

Escherichia coli merupakan bakteri yang memiliki bentuk bulat cenderung batang pendek, gram negatif, tidak berspora, ukuran 0,4-0,7 mikron, terdapat sendiri-sendiri, berpasangan dan rangkaian pendek, sebagian besar gerak positif dengan flagel peritrich, dan mempunyai kapsul. Bakteri gram negatif memiliki membran luar yang terdiri dari tiga lapis yaitu lipoprotein, lipopolisakarida (LPS), dan fosfolipid. Porin adalah transmembran yang berbentuk saluran. *Escherichia coli*

merupakan flora normal saluran pencernaan, dan salah satu bakteri yang menghasilkan indol positif dan tergolong bakteri yang cepat meragi laktosa (Hasibuan, 2016). Pada kondisi tertentu *Escherichia coli* dapat ditemukan pula pada saluran reproduksi wanita, menyebabkan infeksi saluran kemih pada masa post partum (Hidayah, S.E., 2017).

Sifat-sifat khusus dari bakteri *Escherichia coli* yaitu, merupakan parasit dalam saluran pencernaan makanan manusia dan hewan berdarah panas, keluarga dari spesies ini memfermentasikan laktosa dan glukosa dengan menghasilkan asam dan gas, menghasilkan asam dalam jumlah yang banyak dari glukosa tetapi tidak menghasilkan acethyl methyi carbinol, ditemukan dalam faeces. *Escherichia coli* akan menjadi patogen bila pindah dari habitatnya yang normal kebagian yang lain dalam inangnya (Melliawati, 2015).

Potensi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit sebagai antibakteri penyebab infeksi post partum dilakukan pula pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara in vitro. Pengukuran pertumbuhan *Escherichia coli* berdasarkan hasil pengukuran diameter zona bening antara ekstrak dengan

sisi terluar zona bening, di mana zona bening merupakan parameter daya hambat pertumbuhan *Escherichia coli* secara in vitro, sebagaimana tampak pada Gambar 6.5.



Gambar 6.11 Pengukuran Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli*

Formulasi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit disusun dalam 4 formulasi kombinasi, daun Tambora : daun Sembalit Angin : rimpang Kunyit, yaitu 3:2:1, 2:3:1, 1:2:3, dan 2:1:3. Konsentrasi ekstrak dirancang dari 30%, 40%, 50%, 60%, dan 80%. Potensi formulasi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap bakteri *Escherichia coli* secara in vitro, disajikan pada Tabel 6.21.

Tabel 6.21 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 3:2:1

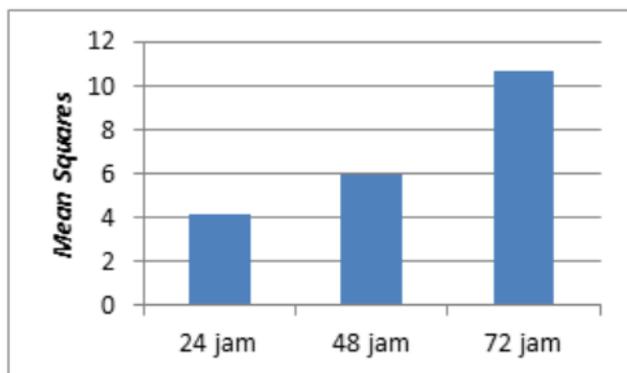
Perlakuan Kombinasi Ekstrak 3:2:1	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	6,4	2,43	2,63
Aquades (-)	0	0	0
30%	9,84	3,29	5,06
40%	10,12	3,68	4,32
50%	13,8	3,85	4,33
60%	11,15	3,345	4,47
70%	9,04	2,81	4,48
80%	7,7	2,66	3,40

Data dianalisis statistik Anava untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*.

Tabel 6.22 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 3:2:1

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	29,281	,000	41,551	,000	74,620	,000
Within Groups	12,439		13,928		15,444	
Total	41,720		55,479		90,064	

Data hasil analisis statistik ANAVA di atas didukung dengan dengan perbandingan *mean square* dalam bentuk diagram pada Gambar 6.12.



Gambar 6.12 Mean Square Formula Kombinasi 3:2:1 (*Escherichia coli*)

Data rekapitulasi pada Tabel 6.22 dilakukan pengamatan pada masa inkubasi 24 jam, 48 jam, dan 72 jam dan diketahui bahwa hasil analisis variansi perlakuan ekstrak kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada signifikansi 1% untuk seluruh perlakuan. Perbandingan *mean square* mempertegas signifikansi pengaruh formulasi 3:2:1, dimana masa inkubasi 72jam memiliki nilai *mean square* lebih besar. Konsentrasi optimal dan

efektif ekstrak, dijelaskan pada Tabel 6.23, Tabel 6.24, dan Tabel 6.25.

Tabel 6.23 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 3:2:1 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi 3:2:1	Notasi Subset for alpha = 0.01			
	N	1	2	3
P2	4	a		
P1	4		b	
P8	4		b	c
P7	4		b	c
P3	4		b	c
P4	4		b	c
P6	4		b	c
P5	4			c
Sig.		1,000	,048	,013

Berdasarkan hasil dari uji Duncan 1%, seluruh perlakuan tidak berbeda signifikan terhadap kontrol positif (P1), dalam arti bahwa pada konsentrasi tsb memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Tetapi terdapat perbedaan yang sangat nyata jika dibandingkan dengan P5 atau konsentrasi 50%, sehingga konsentrasi 50% dapat disimpulkan sebagai konsentrasi yang efektif dan optimum dalam menghambat

pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada formulasi kombinasi 3:2:1 masa inkubasi 24 jam.

Tabel 6.24 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 3:2:1 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 3:2:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01	
		1	2
P2	4	a	
P1	4		b
P8	4		b
P7	4		b
P3	4		b
P6	4		b
P4	4		b
P5	4		b
Sig.		1,000	,028

Pada waktu pengamatan 48 jam, perlakuan P5 mengalami penurunan daya hambat, tampak dari hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.24 menunjukkan seluruh taraf perlakuan tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), dalam arti bahwa pada konsentrasi tsb tetap memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Masa inkubasi 48 jam daya hambat konsentrasi 50% setara dengan konsentrasi minimum, sehingga

konsentrasi 30% dianggap cukup efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada formulasi kombinasi 3:2:1, meskipun daya hambat optimum masih pada taraf 50%.

Tabel 6.25 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 3:2:1 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 3:2:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4		b	
P8	4		b	c
P4	4		b	c
P5	4		b	c
P6	4			c
P7	4			c
P3	4			c
Sig.		1,000	,010	,014

Taraf perlakuan penelitian P3, P4, P5, P6, P7 tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi paling pekat dalam penelitian (P8), tetapi P3, P6, dan P7 berbeda signifikan terhadap kontrol positif (P1) pada masa inkubasi 72 jam. Tabel 6.25 menunjukkan interpretasi data konsentrasi 30% tetap merupakan konsentrasi efektif, meskipun tidak berbeda signifikan dibandingkan taraf P6,

dan P7. Data ini juga memberikan informasi bahwa konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada formulasi kombinasi 3:2:1.

Formulasi kombinasi 2:3:1 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap bakteri *Escherichia coli* secara in vitro (Tabel 6.26).

Tabel 6.26 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 2:3:1

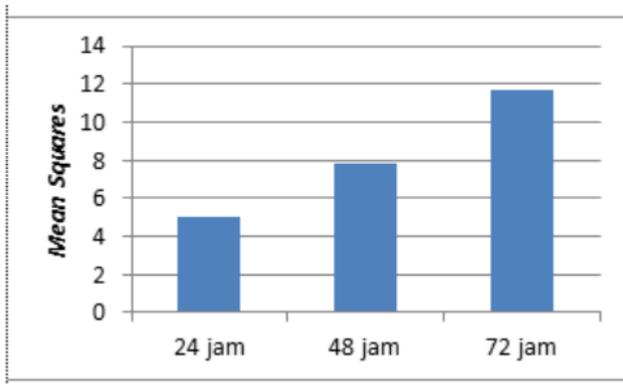
Perlakuan Kombinasi Ekstrak 2:3:1	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	1,58	2,43	2,03
Aquades (-)	0	0	0
30%	2,36	3,15	3,78
40%	2,02	4,03	4,71
50%	2,12	3,19	3,81
60%	3,75	4,14	4,90
70%	2,96	4,32	4,81
80%	2,95	3,47	4,31

Hasil analisis data formulasi kombinasi 2:3:1 dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* disajikan pada Tabel 6.27.

Tabel 6.27 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 2:3:1

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	35,253	,000	54,564	,000	81,513	,000
Within Groups	14,164		21,244		25,504	
Total	49,417		75,808		107,016	

Data hasil analisis statistik ANAVA di atas didukung dengan dengan perbandingan *mean square* dalam bentuk diagram pada Gambar 6.13.



Gambar 6.13 Mean Square Formula Kombinasi 2:3:1 (*Escherichia coli*)

Perlakuan ekstrak kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada signifikansi 1%, pada waktu perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam (Tabel 6.27). Gambar 6.13 disajikan dalam bentuk diagram perbandingan *mean square* mempertegas signifikansi bahwa nilai *means square* untuk formulasi 2:3:1 masa inkubasi 72 jam lebih besar. Uraian signifikansi antar taraf konsentrasi disajikan pada Tabel 6.28, Tabel 6.29, dan Tabel 6.30.

Tabel 6.28 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 2:3:1 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi 2:3:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4		b	
P4	4		b	
P5	4		b	c
P3	4		b	c
P8	4		b	c
P7	4		b	c
P6	4			c
Sig.		1,000	,033	,012

Seluruh taraf perlakuan penelitian tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1% (Tabel 6.28), kecuali taraf perlakuan P6. Konsentrasi tersebut berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan P1 dan P4 (40%). Oleh karena itu, konsentrasi 60% dapat disimpulkan sebagai konsentrasi optimum, sedangkan konsentrasi 30% sebagai konsentrasi efektif untuk formulasi 2:3:1 dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* masa inkubasi 24 jam.

Tabel 6.29 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 2:3:1 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 2:3:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01	
		1	2
P2	4	a	
P1	4		b
P3	4		b
P5	4		b
P8	4		b
P4	4		b
P6	4		b
P7	4		b
Sig.		1,000	,019

Pengaruh perlakuan pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam memiliki interpretasi yang hampir sama, di mana hasil uji Duncan 1% (Tabel 6.29) menunjukkan perlakuan seluruh taraf konsentrasi tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga penafsiran terjadi penurunan daya bunuh senyawa metabolit sekunder pada konsentrasi optimum (60%) pada waktu 48 jam. Pada waktu inkubasi 48 jam menunjukkan bahwa konsentrasi P3 (30%) sebagai konsentrasi efektif, karena tidak berbeda dengan konsentrasi yang lebih tinggi lainnya, tetapi konsentrasi optimum berada pada taraf 70%, lebih besar konsentrasi dibandingkan taraf 60%.

Tabel 6.30 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 2:3:1 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 2:3:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4	a	b	
P3	4		b	c
P5	4		b	c
P8	4			c
P4	4			c
P7	4			c
P6	4			c
Sig.		,010	,028	,186

Pengamatan pada masa inkubasi 72 jam (Tabel 6.30) kontrol positif berupa *Chloramfenicol* 0.1% (P1) mengalami penurunan daya bunuh yang sangat signifikan, dibuktikan dengan notasi yang tidak berbeda dibandingkan kontrol negatif penelitian (P2). Demikian pula dengan konsentrasi efektif 30% yang mengalami penurunan daya bunuh yang sangat signifikan, sehingga efektifitas daya hambat berada taraf P4 (40%). Akan tetapi, konsentrasi 40% tidak berbeda signifikan dengan seluruh taraf perlakuan penelitian.

Konsentrasi optimum penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* formulasi kombinasi 3:2:1 dan 2:3:1 juga hampir sama, Pengujian senyawa metabolit sekunder dalam bahan alam secara *in vitro* dengan menggunakan kertas cakram memiliki keterbatasan dalam hal penyerapan ekstrak, sehingga secara teknis kadang mempengaruhi daya hambat. Penghambatan pertumbuhan secara *in vitro* ditandai dengan adanya zona bening antara sisi terluar paper disc yang mengandung ekstrak dengan koloni terjauh yang berhasil tumbuh di permukaan medium pertumbuhan. Akan tetapi, metode ini cukup dapat digunakan untuk memberikan gambaran dasar potensi bahan alam tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Selanjutnya, untuk formulasi kombinasi 1:2:3 daun Tambora, daun Sembalit

Angin, rimpang Kunyit terhadap bakteri *Escherichia coli* secara in vitro disajikan pada Tabel 6.31.

Tabel 6.31 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 1:2:3

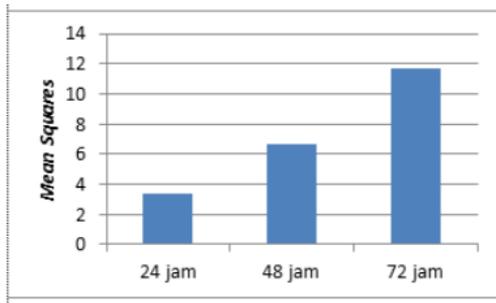
Perlakuan Kombinasi Ekstrak 1:2:3	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	1,41	1,75	1,79
Aquades (-)	0	0	0
30%	2,81	3,12	4,07
40%	1,78	3,79	4,24
50%	2,48	2,84	4,15
60%	2,35	2,84	4,57
70%	2,17	3,28	4,14
80%	2,41	4,03	4,56

Formulasi kombinasi 1:2:3 menekankan pada kombinasi rimpang kunyit sebagai komponen kombinasi yang paling dominan, yang nantinya akan diketahui perbandingan respon daya hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang lebih baik. Data hasil analisis varians satu jalur formulasi kombinasi 1:2:3 ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit disajikan pada Tabel 6.32.

Tabel 6.32 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 1:2:3

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	23,698	,000	46,808	,000	76,408	,000
Within Groups	11,190		15,282		18,142	
Total	34,887		62,090		94,550	

Nilai *mean square* dalam bentuk diagram pada Gambar 6.14 memperkuat data hasil analisis pada Tabel 6.32.



Gambar 6.14 Mean Square Formula Kombinasi 1:2:3 (*Escherichia coli*)

Formulasi kombinasi ekstrak 1:2:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada signifikansi 1%, pada waktu

perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam (Tabel 6.32). Signifikansi dipertegas dengan perbandingan *mean square* bahwa inkubasi 72 jam lebih besar (Gambar 6.14). Data uji lanjut Duncan selanjutnya disajikan pada Tabel 6.33, Tabel 6.34, dan Tabel 6.35.

Tabel 6.33 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 1:2:3 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi	N	Notasi Subset for alpha = 0.01	
		1	2
1:2:3			
P2	4	a	
P1	4		b
P4	4		b
P7	4		b
P6	4		b
P8	4		b
P5	4		b
P3	4		b
Sig.		1,000	,018

Perlakuan konsentrasi ekstrak pada formulasi kombinasi 1:2:3 memiliki daya hambat tidak berbeda signifikan antar masing-masing konsentrasi. Hasil dari uji Duncan 1% Tabel 6.13 menunjukkan perlakuan tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Tetapi konsentrasi berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan kontrol

negatif penelitian (P2). Oleh karena tidak terdapat perbedaan signifikan antara konsentrasi terendah 30% (P3) dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih besar (80%), maka konsentrasi 30% dapat dinyatakan konsentrasi efektif dan optimum dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* masa inkubasi 24 jam.

Untuk mengetahui efektifitas kemampuan daya bunuh senyawa metabolit sekunder dalam bahan alam pada formulasi kombinasi 1:2:3, selanjutnya dilakukan pengamatan pada masa inkubasi 48 jam dan 72 jam.

Tabel 6.34 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 1:2:3 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4		b	
P5	4		b	c
P6	4		b	c
P3	4		b	c
P7	4		b	c
P4	4			c
P8	4			c
Sig.		1,000	,021	,073

Pengaruh perlakuan pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam pun memiliki interpretasi yang hampir sama, dalam hal konsentrasi efektif dalam menghambat

pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, di mana konsentrasi 30% masih paling efektif. Efektifitas konsentrasi minimum pada P3 disebabkan karena P3 tidak berbeda secara statistik dibandingkan taraf konsentrasi lainnya. (Tabel 6.14). P3, P5, P6, dan P7 tidak berbeda signifikan dengan dengan P1, sehingga ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Ketika rimpang kunyit dijadikan komposisi utama, maka penghambatan optimum hanya dapat dilakukan dengan konsentrasi yang lebih pekat, yaitu 80%.

Tabel 6.35 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 1:2:3 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4		b	
P3	4			c
P7	4			c
P5	4			c
P4	4			c
P8	4			c
P6	4			c
Sig.		1,000	1,000	,487

Masa inkubasi 72 jam (Tabel 6.35) kontrol positif berupa *Chloramfenicol* 0.1% (P1) mengalami penurunan daya bunuh yang sangat signifikan, dibuktikan dengan notasi yang berbeda dibandingkan seluruh taraf perlakuan

penelitian. Meskipun konsentrasi yang lebih besar P8 tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi lainnya pada formulasi kombinasi 3:2:1 Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.35 juga menunjukkan data empirik bahwa konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif dan konsentrasi 60% sebagai konsentrasi optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada formulasi kombinasi 1:2:3.

Formulasi kombinasi 2:1:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap *Escherichia coli* disajikan pada Tabel 6.36 dan Tabel 6.37.

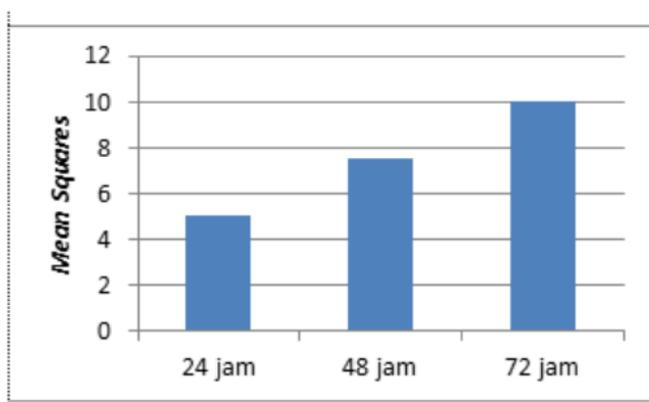
Tabel 6.36 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 2:1:3

Perlakuan Kombinasi Ekstrak 2:1:3	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	1,36	2,01	1,79
Aquades (-)	0	0	0
30%	2,45	3,25	3,77
40%	1,87	4,03	4,62
50%	2,68	2,25	3,15
60%	1,715	2,30	3,82
70%	1,31	3,1	3,19
80%	3,81	4,37	4,84

Tabel 6.37 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 2:1:3

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	35,378	,000	52,475	,000	70,376	,000
Within Groups	9,794		8,051		7,964	
Total	45,173		60,526		78,340	

Berdasarkan rekapitulasi hasil analisis statistik menunjukkan formulasi kombinasi 2:1:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit berpengaruh signifikan, dibuktikan dengan nilai Sig. $0.000 < 0.01$.



Gambar 6.15 Mean Square Formula Kombinasi 2:1:3 (*Escherichia coli*)

Gambar 6.15 mempertegas data dengan perbandingan *mean square*. Perbandingan *mean square* memberikan fakta masa inkubasi 72 jam memiliki perbedaan capaian optimalisasi pengaruh variabel yang lebih kuat dibandingkan 24 jam dan 48 jam. Uraian hasil uji Duncan disajikan Tabel 6.38, Tabel 6.39, dan Tabel 6.40.

Tabel 6.38 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 2:1:3 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
1:2:3				
P2	4	a		
P7	4		b	
P1	4		b	
P6	4		b	
P4	4		b	
P3	4		b	
P5	4		b	c
P8	4			c
Sig.		1,000	,012	,020

Perlakuan konsentrasi ekstrak pada formulasi kombinasi 2:1:3 memiliki daya hambat yang sama dengan formulasi 1:2:3, dimana rimpang kunyit yang menjadi komposisi utama. Seluruh taraf konsentrasi dan tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Konsentrasi efektif

pada formulasi ini berada pada konsentrasi 30% sedangkan konsentrasi 80% diinterpretasikan sebagai konsentrasi optimum untuk formulasi 2:1:3 dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* masa inkubasi 24 jam. Pengamatan pada masa inkubasi 48 jam disajikan pada Tabel 6.39.

Tabel 6.39 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 2:1:3 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 2:1:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
P2	4	a			
P1	4		b		
P5	4		b		
P6	4		b		
P7	4		b	c	
P3	4		b	c	d
P4	4			c	d
P8	4				d
Sig.		1,000	,011	,041	,015

Pengaruh perlakuan pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam pun memiliki interpretasi yang hampir sama. Hasil uji Duncan 1% (Tabel 6.39) menunjukkan antar seluruh taraf konsentrasi dan tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol*

0.1%. Akan tetapi konsentrasi 80% (P8) berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan kontrol positif penelitian. Konsentrasi 30% dinyatakan konsentrasi yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* masa inkubasi 48 jam, dan konsentrasi, karena tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi lainnya.

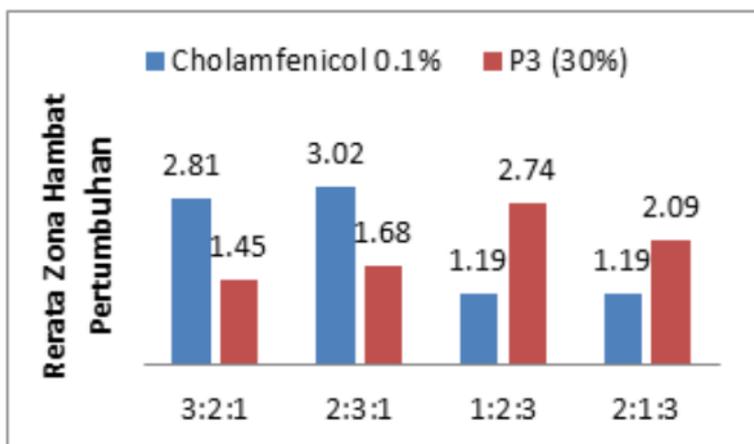
Tabel 6.40 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Escherichia coli* Kombinasi 2:1:3 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 2:1:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.0			
		1	2	3	4
P2	4	a			
P1	4		b		
P5	4			c	
P7	4			c	
P3	4			c	d
P6	4			c	d
P4	4				d
P8	4				d
Sig.		1,000	1,000	,143	,023

Sebagaimana formulasi kombinasi 1:2:3, masa inkubasi 72 jam kontrol positif berupa *Chloramfenicol* 0.1% (P1) untuk formulasi 2:3:1 juga mengalami penurunan daya bunuh yang sangat signifikan, dibuktikan dengan notasi yang berbeda dengan seluruh taraf

perlakuan. Konsentrasi yang lebih pekat pada formulasi 2:1:3 juga mempunyai daya hambat yang tidak lebih baik dibandingkan konsentrasi yang lebih rendah, sebagaimana pada formulasi yang lain. Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.40 juga menunjukkan data empirik bahwa konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif. Daya hambat optimum berada pada konsentrasi yang paling pekat (80%) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada formulasi kombinasi 2:1:3.

Meskipun secara keseluruhan formulasi kombinasi ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan pada taraf signifikansi 1% terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, tetapi perbandingan efektifitas daya bunuh pada masing-masing formulasi kombinasi dapat diketahui dengan membandingkan potensi formulasi kombinasi secara statistik. Perbandingan potensi formulasi kombinasi ekstrak yang paling potensial dan dapat dijadikan sebagai rekomendasi informasi untuk memperkuat fakta ilmiah potensi bahan alam yang secara budaya diyakini berkhasiat obat dalam penanganan penyakit yang disebabkan oleh bakteri penyebab infeksi post partum, salah satunya adalah bakteri *Escherichia coli*. Perbandingan potensi bahan alam tersebut disajikan pada Gambar 6.16 dan Gambar 6.17, melalui perbandingan rerata zona hambat efektif dan optimum pertumbuhan dari keseluruhan formulasi kombinasi.

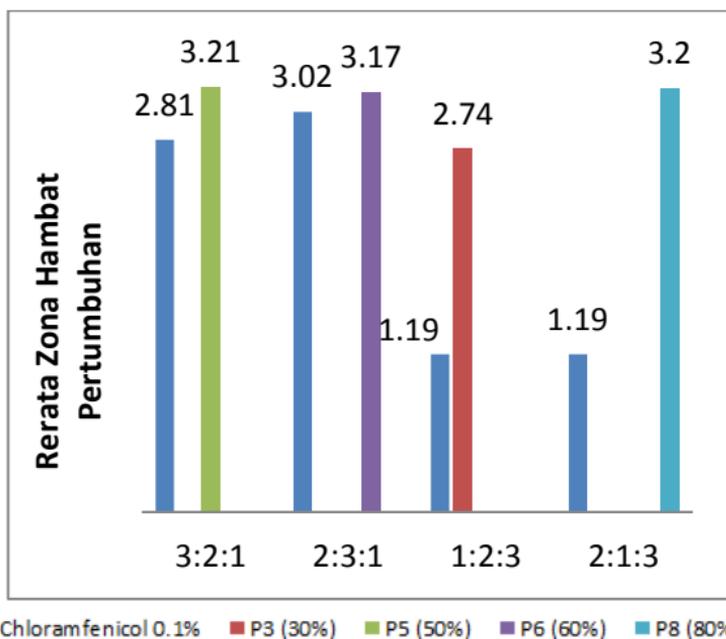


Gambar 6.16 Perbandingan Kemampuan Penghambatan Pertumbuhan Konsentrasi Ekstrak Efektif Formulasi Kombinasi dengan Kontrol Positif Terhadap *Escherichia coli*

Perbandingan daya hambat efektif dari masing-masing formulasi kombinasi ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit pada Gambar 6.16 menggambarkan formulasi 1:2:3 merupakan formula terbaik, dengan daya hambat terbesar dibandingkan dengan formulasi lainnya. Formulasi 3:2:1 memiliki kombinasi daun Tambora lebih besar, sedangkan formulasi 2:3:1 mengandung daun Sembalit Angin yang lebih besar, yaitu 50% dari komposisi seluruhnya. Jika dilihat dari rerata zona hambat yang terbentuk, formulasi 3:2:1 dan 2:3:1 tidak lebih baik dibandingkan dengan

Chloramfenicol 0.1% dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Sebaliknya, pada formulasi 1:2:3 dan 2:1:3 memiliki kandungan rimpang kunyit yang lebih besar, yaitu 50% dari komposisi seluruhnya. Rerata zona hambat yang ditunjukkan formulasi 1:2:3 dan 2:1:3 lebih baik dibandingkan dengan *Chloramfenicol* 0.1% dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Fakta ini membuktikan potensi daun rimpang Kunyit lebih baik sebagai antibakteri *Escherichia coli* dalam masa inkubasi 24 jam, dibandingkan daun Tambora dan Sembalit Angin.

Formulasi kombinasi 1:2:3 mengkombinasikan potensi rimpang Kunyit sebagai komposisi utama, yaitu Tambora 20% daun Sembalit Angin 30%, dan rimpang Kunyit 50%. Indikator zona bening yang terbentuk antara sisi terluar paper disc yang mengandung ekstrak memiliki kemampuan daya hambat paling efektif pada konsentrasi 30%. Konsentrasi ini merupakan konsentrasi paling rendah dalam rentang perlakuan penelitian, tetapi memiliki daya hambat yang berbeda signifikan dibandingkan kontrol positif (*Chloramfenicol* 0.1%). Hal ini membuktikan potensinya sebagai antibakteri *Escherichia coli*. Efektifitas daya hambat formulasi kombinasi 1:2:3 ekstrak diperkuat dengan perbandingan konsentrasi optimum ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (Gambar 6.17).



Gambar 6.17 Perbandingan Kemampuan Penghambatan Pertumbuhan Konsentrasi Ekstrak Optimum Formulasi Kombinasi dengan Kontrol Positif Terhadap *Escherichia coli*

Perbandingan rerata zona hambat pertumbuhan dari seluruh formulasi kombinasi yang ditunjukkan Gambar 6.17 memberikan penegasan potensi seluruh formulasi kombinasi yang lebih baik dari *Cholamfenicol* 0.1%. Daya hambat optimum yang memiliki zona hambat terbesar terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

dengan konsentrasi terendah ada pada formulasi kombinasi 1:2:3. Data ini memberi interpretasi bahwa dengan konsentrasi 30% formulasi kombinasi 1:2:3 memiliki daya hambat pertumbuhan lebih kuat dibandingkan dengan formulasi lainnya, di mana formulasi 3:2:1, 2:3:1, dan 2:1:3 memiliki daya hambat optimum pada konsentrasi yang lebih tinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, yaitu pada konsentrasi 50%, 60%, dan 70%.

3. *Bacillus subtilis*

Klasifikasi *Bacillus subtilis* menurut Rahmawati (2015) adalah sebagai berikut:

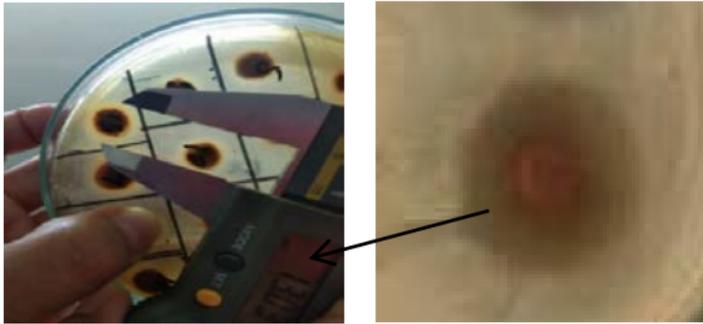
Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus subtilis</i>

Bacillus subtilis merupakan bakteri penyebab infeksi, dimana bakteri ini dapat menghasilkan berbagai enzim

yang pada dasarnya tidak toksik tetapi bakteri tersebut berperan penting dalam proses infeksi. Bakteri *Bacillus subtilis* salah satu bakteri Gram positif, bersifat aerobik dan mampu membentuk endospora. *Bacillus subtilis* biasa terdapat pada tanah, air dan udara. Bakteri ini dapat menginfeksi mata, meningitis, luka dan penyakit lainnya, salah satunya dapat pula menginfeksi saluran reproduksi. *Bacillus subtilis* berbentuk batang tebal maupun tipis, rantai maupun tunggal. Suhu optimum untuk pertumbuhannya sekitar 25⁰-35⁰C, pH yang cocok untuk pertumbuhannya sekitar 7-8. Media sebagai prantara untuk hidupnya bakteri *Bacillus subtilis* ini antara lain tanah, udara, air dan materi tumbuhan yang terdekomposisi. Selain itu *Bacillus subtilis* juga biasa berada pada bahan makanan seperti susu, daging, nasi dan pasta.

Potensi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit sebagai antibakteri penyebab infeksi post partum dilakukan pula pada pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* secara in vitro. Pengukuran pertumbuhan *Bacillus subtilis* berdasarkan hasil pengukuran diameter zona bening antara ekstrak dengan sisi terluar zona bening, di mana zona bening merupakan

parameter daya hambat pertumbuhan *Bacillus subtilis* secara in vitro, sebagaimana tampak pada Gambar 6.18.



**Gambar 6.18 Pengukuran Zona Hambat
Pertumbuhan *Bacillus subtilis***

Formulasi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit disusun dalam 4 formulasi kombinasi, daun Tambora : daun Sembalit Angin : rimpang Kunyit, juga disusun formulasi dan konsentrasi yang sama dengan perlakuan pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Perlakuan ini bertujuan untuk lebih mengetahui kecenderungan pengaruh bahan alam dalam formulasi tertentu lebih potensial terhadap bakteri target. Potensi formulasi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap bakteri *Bacillus subtilis* secara in vitro, disajikan pada Tabel 6.41.

Tabel 6.41 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 3:2:1

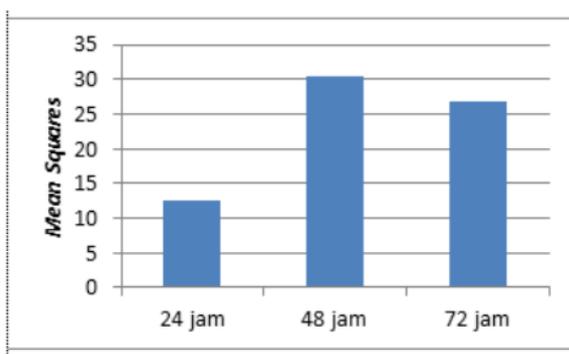
Perlakuan Kombinasi Ekstrak 3:2:1	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	2.74	3.37	2.57
Aquades (-)	0	0	0
30%	3.61	6.24	3.77
40%	5.32	7.72	7.57
50%	4.645	6.97	5.52
60%	4.19	5.99	6.17
70%	5.27	6.17	6.82
80%	4.81	1.69	2.57

Tabel 6.41 menyajikan data rekapitulasi hasil analisis statistik Anava satu jalur dan dilanjutkan uji Duncan 1% pada Tabel 6.42 pada formulasi kombinasi 3:2:1. Bakteri *Bacillus subtilis* merupakan salah satu bakteri Gram positif, bersifat aerobik dan mampu membentuk endospore, dapat menginfeksi mata, meningitis, luka dan penyakit lainnya, dan dapat pula menginfeksi saluran reproduksi. Oleh karena itu, penting untuk mengetahui konsentrasi optimal dan efektif pada formulasi kombinasi yang tepat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*.

Tabel 6.42 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 3:2:1

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	87.804	,000	213.198	,000	186.792	,000
Within Groups	45.617		51.310		44.473	
Total	133.420		264.508		231.265	

Data hasil analisis statistik ANAVA di atas didukung dengan dengan perbandingan *mean square* dalam bentuk diagram pada Gambar 6.19.



Gambar 6.19 Mean Square Formulasi Kombinasi 3:2:1 *Bacillus subtilis*

Data rekapitulasi pada Tabel 6.42 diketahui bahwa hasil analisis variansi perlakuan ekstrak kombinasi daun

Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* pada signifikansi 1%, pada waktu perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Diagram perbandingan *mean square* mempertegas signifikansi pengaruh formulasi 3:2:1, dimana masa inkubasi 48 jam memiliki nilai *mean square* lebih besar. Konsentrasi optimal dan efektif ekstrak, dijelaskan pada Tabel 6.43, Tabel 6.44, dan Tabel 6.45.

Tabel 6.43 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 3:2:1 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.0	
		1	2
P2	4	a	
P1	4		b
P3	4		b
P6	4		b
P5	4		b
P8	4		b
P7	4		b
P4	4		b
Sig.		1.000	.028

Berdasarkan hasil dari uji Duncan 1%, formulasi kombinasi seluruh taraf perlakuan tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga dapat diinterpretasikan memiliki kemampuan yang sama dengan

Chloramfenicol 0.1%. Tetapi konsentrasi tersebut berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan kontrol negatif penelitian. Oleh karena tidak ada perbedaan yang signifikan antar masing-masing konsentrasi secara statistik, maka konsentrasi 30% dapat disimpulkan sebagai konsentrasi yang efektif sebagai konsentrasi minimum rentang perlakuan penelitian, sedangkan konsentrasi optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* pada formulasi kombinasi 3:2:1 masa inkubasi 24 jam ada pada taraf 40% (P4).

Tabel 6.44 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 3:2:1 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 3:2:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
P2	4	a			
P8	4	a	b		
P1	4		b	c	
P6	4			c	d
P7	4			c	d
P3	4			c	d
P5	4				d
P4	4				d
Sig.		.115	.118	.016	.147

Hasil dari uji Duncan 1%, bahwa terjadi penurunan daya hambat yang sangat signifikan pada taraf P8 (80%), sehingga tidak berbeda secara statistik dengan kontrol

negatif penelitian. Demikian pula dengan P3, P6, P7, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), dalam arti bahwa pada konsentrasi tsb tetap memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Masa inkubasi 48 jam memiliki daya hambat efektif yang sama dengan 24 jam, dimana konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif dan optimum pada taraf 40% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* pada formulasi kombinasi 3:2:1 masa inkubasi 48 jam. Karena tidak ada perbedaan signifikan antara P3, P4, P5, P6, dan P7

Tabel 6.45 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 3:2:1 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 3:2:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
P2	4	a			
P1	4	a	b		
P8	4	a	b		
P3	4		b	c	
P5	4			c	d
P6	4			c	d
P7	4				d
P4	4				d
Sig.		.018	.250	.026	.061

Perlakuan penelitian P3, P5, P6, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1) dan juga kontrol positif pada masa inkubasi 72 jam. Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.45 menunjukkan interpretasi data bahwa kontrol positif penelitian mengalami penurunan daya hambatnya, karena tidak berbeda dengan kontrol negatif penelitian. Penurunan daya hambat senyawa metabolit sekunder sebagai antibakteri secara alami akan mengalami penurunan, karena akan terdegradasi oleh aktivitas metabolik mikroorganisme. Di samping itu, terdapat peristiwa antagonisme yang cukup kuat dalam waktu tertentu secara *in vitro* antar masing-masing mikroba. Meskipun demikian, masa inkubasi 72 jam memberikan fakta ilmiah bahwa konsentrasi 30% sudah tidak efektif lagi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* pada formulasi kombinasi 3:2:1. Konsentrasi efektif dan optimum berada pada taraf 40% untuk masa inkubasi 72 jam, karena tidak ada perbedaan signifikan antara P4, P5, P6, dan P7. Konsentrasi hambat minimum atau konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri yang semula pada konsentrasi 30% tidak efektif lagi dalam menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga pada masa inkubasi 72 jam berada pada taraf yang lebih pekat, yaitu taraf 40%.

Formulasi kombinasi 2:3:1 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap bakteri *Bacillus subtilis* secara in vitro (Tabel 6.46).

Tabel 6.46 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 2:3:1

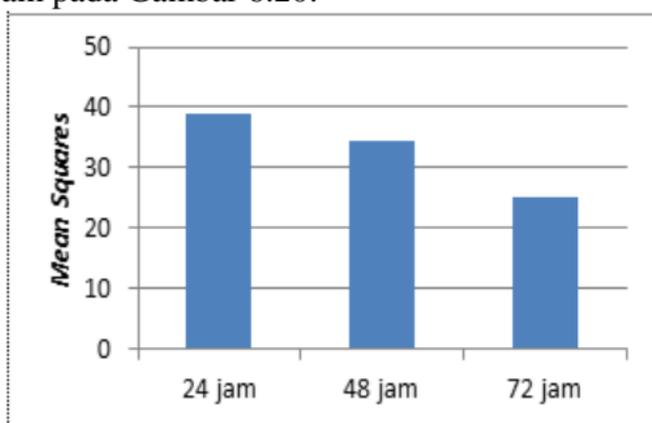
Perlakuan Kombinasi Ekstrak 2:3:1	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	2.64	3.17	3.59
Aquades (-)	0	0	0
30%	3.75	5.24	3.47
40%	4.92	5.84	5.97
50%	5.92	6.24	6.97
60%	5.64	6.19	6.02
70%	5.36	6.47	6.39
80%	10.9	10.2	7.59

Rekapitulasi data zona hambat pada Tabel 6.46 memberikan gambaran secara lengkap rerata zona hambat pada masa inkubasi 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Hasil analisis data formulasi kombinasi 2:3:1 dalam menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis* disajikan pada Tabel 6.47.

Tabel 6.47 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 2:3:1

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	272.001	,000	241.040	,000	175.229	,000
Within Groups	33.634		56.685		76.760	
Total	305.635		297.725		251.989	

Data hasil analisis statistik ANAVA di atas didukung dengan dengan perbandingan *mean square* dalam bentuk diagram pada Gambar 6.20.



Gambar 6.20 Mean Square Formulasi Kombinasi 2:3:1 *Bacillus subtilis*

Data rekapitulasi pada Tabel 6.46 diketahui bahwa hasil analisis variansi perlakuan ekstrak kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* pada signifikansi 1%, pada waktu perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Gambar 6.6 disajikan dalam bentuk diagram perbandingan *mean square* mempertegas signifikansi bahwa nilai *means square* untuk formulasi 2:3:1 masa inkubasi 72 jam lebih besar. Konsentrasi optimal dan efektif ekstrak, pada Tabel 6.48, Tabel 6.49, dan Tabel 6.50.

Tabel 6.48 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 2:3:1 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi	N	Notasi Subset for alpha = 0.01			
		1	2	3	4
3:2:1					
P2	4	a			
P1	4		b		
P3	4		b	c	
P4	4		b	c	
P7	4			c	
P6	4			c	
P5	4			c	
P8	4				d
Sig.		1.000	.016	.027	1.000

Hasil dari uji Duncan 1% pada Tabel 6.8 diinterpretasikan bahwa perlakuan P3, dan P4 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Tetapi konsentrasi tersebut berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan P8 (80%. Konsentrasi P3 (30%), tidak berbeda signifikan P4, P5, P6, dan P7. Sebaliknya, P8 (80%) berbeda terhadap seluruh taraf lainnya, sehingga konsentrasi 80% dapat disimpulkan sebagai konsentrasi yang efektif, dan konsentrasi optimum untuk formulasi 2:3:1.

Tabel 6.49 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 2:3:1 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 2:3:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4		b	
P3	4		b	
P4	4		b	
P6	4		b	
P5	4		b	
P7	4		b	
P8	4			c
Sig.		1.000	.012	1.000

Pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam memiliki interpretasi yang hampir sama, di mana perlakuan P3, P4, P5, P6, P7, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga penafsiran perbandingan terhadap daya bunuh senyawa metabolit sekunder pada formulasi 2:3:1 yang dimiliki konsentrasi tsb dapat dianggap setara dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Pada waktu inkubasi 48 jam menunjukkan bahwa konsentrasi P8 tidak berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan P3 (30%), sehingga P3 (30%) sebagai konsentrasi efektif dan optimum pada taraf 80%.

Tabel 6.50 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 2:3:1 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 2:3:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P3	4	a	b	
P1	4	a	b	
P4	4		b	c
P6	4		b	c
P7	4		b	c
P5	4		b	c
P8	4			c
Sig.		.012	.020	.262

Masa inkubasi 72 jam (Tabel 6.50) kontrol positif berupa *Chloramfenicol* 0.1% (P1) mengalami penurunan daya hambat yang sangat signifikan, dibuktikan dengan notasi yang tidak berbeda dibandingkan kontrol negatif penelitian (P2). Tidak ada perbedaan yang signifikan antara P3 (30% jika dibandingkan dengan taraf yang lebih pekat lainnya, seperti P4, P5, P6, dan P7. Sebaliknya, terdapat perbedaan signifikan antara P8 (80%) terhadap P3 dan kontrol penelitian. Dengan demikian, konsentrasi efektif untuk formulasi kombinasi 2:3:1 pada masa inkubasi 72 jam adalah pada taraf 40%, dan konsentrasi optimum 80%.

Konsentrasi efektif dan optimum penghambatan pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* formulasi kombinasi 3:2:1 dan 2:3:1 hampir sama. Hal ini ada kemungkinan dipengaruhi oleh komposisi daun Tambora dan daun Sembalit Angin yang menjadi bahan utama campuran dalam komposisinya. Hasil pengujian ini mempertegas potensi daun Tambora dan daun Sembalit Angin dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*.

Selanjutnya, untuk memperluas hasil kajian terkait potensi bahan alam tersebut, maka dilakukan pengujian terhadap beberapa formulasi kombinasi lainnya, seperti pada perbandingan 1:2:3 dan 2:1:3. Perbandingan yang menjadikan rimpang Kunyit sebagai bahan utama, yang

diberikan perlakuan terhadap objek mikroba yang sama sebagai target. Rekapitulasi zona hambat pertumbuhan untuk formulasi kombinasi 1:2:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap bakteri *Bacillus subtilis* secara in vitro disajikan pada Tabel 6.51.

Tabel 6.51 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 1:2:3

Perlakuan Kombinasi Ekstrak 1:2:3	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	2.57	2.99	2.74
Aquades (-)	0	0	0
30%	4.74	6.64	4.27
40%	5.11	6.34	3.39
50%	3.65	5.37	4.79
60%	5.05	6.42	7.04
70%	5.73	7.92	5.87
80%	3.67	2.57	3.87

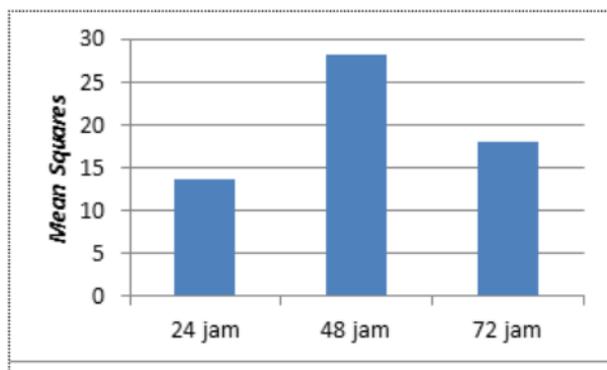
Data formulasi kombinasi 1:2:3 dalam menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis* pada Tabel 6:51 selanjutnya dilanjutkan dengan analisis varians. Formulasi kombinasi 1:2:3 menekankan pada kombinasi rimpang kunyit sebagai komponen kombinasi yang paling dominan, sebagai perbandingan respon daya hambat

pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* yang lebih baik (Tabel 6.52).

Tabel 6.52 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 1:2:3

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	95.488	,000	198.782	,000	125.567	,000
Within Groups	29.579		40.320		18.723	
Total	125.067		239.102		144.290	

Nilai *mean square* dalam bentuk diagram pada Gambar 6.7 memperkuat data hasil analisis pada Tabel 6.21.



Gambar 6.21 Mean Square Formula Kombinasi 1:2:3 *Bacillus subtilis*

Formulasi kombinasi ekstrak 1:2:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* pada signifikansi 1%, pada waktu perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam (Tabel 6.52). Signifikansi dipertegas dengan perbandingan *mean square* bahwa inkubasi 48 jam lebih besar (Gambar 6.21). Data uji lanjut Duncan selanjutnya disajikan pada Tabel 6.53, Tabel 6.54, dan Tabel 6.55.

Tabel 6.53 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 1:2:3 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4		b	
P5	4		b	c
P8	4		b	c
P3	4		b	c
P6	4			c
P4	4			c
P7	4			c
Sig.		1.000	.017	.026

Perlakuan konsentrasi ekstrak pada formulasi kombinasi 1:2:3 memiliki daya hambat yang sama antar

seluruh taraf konsentrasi. Tidak ada perbedaan yang nyata antar konsentrasi P3, P6, dan P8 dibandingkan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Demikian pula dengan konsentrasi minimum 30% tidak berbeda nyata jika dibandingkan dengan seluruh taraf perlakuan. Hal ini menunjukkan konsentrasi paling pekat 80% tidak lebih baik dibandingkan konsentrasi yang lebih encer (30%) dan lebih rendah lainnya. Oleh karena tidak terdapat perbedaan signifikan antara P3, P4, P5, P6, P7, dan P8, maka konsentrasi 30% dapat dinyatakan konsentrasi yang efektif konsentrasi 70% diinterpretasikan sebagai konsentrasi optimum untuk formulasi 1:2:3 dalam menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis* masa inkubasi 24 jam (Tabel 6.53).

Untuk mempertegas hasil pengujian, maka efektifitas senyawa metabolit sekunder dalam formulasi kombinasi 1:2:3 selanjutnya dilakukan pengamatan pada masa inkubasi 48 jam dan 72 jam. Pengamatan ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan daya hambat bakteriasida yang terkandung dalam senyawa metabolit sekunder dalam bahan alam. Data pengamatan untuk masa inkubasi 48 jam disajikan pada Tabel 6.54.

Tabel 6.54 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 1:2:3 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P8	4		b	
P1	4		b	c
P5	4			c
P4	4			c
P6	4			c
P3	4			c
P7	4			c
Sig.		1.000	.647	.016

Pengaruh perlakuan pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam pun memiliki interpretasi yang hampir sama. Hasil uji Duncan 1% (Tabel 6.54) menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara kontrol positif (P1) dengan seluruh taraf perlakuan penelitian, sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Konsentrasi P3 (30%) tidak berbeda secara statistik dengan P4, P5, P6, dan P7, sehingga konsentrasi 30% dinyatakan sebagai konsentrasi yang efektif dan konsentrasi 70% sebagai konsentrasi

optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* masa inkubasi 48 jam.

Tabel 6.55 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 1:2:3 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.0				
		1	2	3	4	5
P2	4	a				
P1	4		b			
P4	4		b	c		
P8	4		b	c		
P3	4		b	c	d	
P5	4			c	d	
P7	4				d	e
P6	4					e
Sig.		1.000	.033	.049	.022	.072

Masa inkubasi 72 jam (Tabel 6.55) kontrol positif berupa *Chloramfenicol* 0.1% (P1) tidak berbeda secara statistik dibandingkan P3, P4, P5, dan P8. Demikian pula dengan, P3 yang tidak berbeda signifikan terhadap terhadap seluruh taraf perlakuan kosentrasi, kecuali terhadap P6. Sebagaimana pada formulasi kombinasi 3:2:1 konsentrasi lebih pekat mempunyai daya hambat yang tidak lebih baik dibandingkan konsentrasi yang lebih

rendah, bahkan cenderung memiliki keterbatasan dalam penyerapan ekstrak. Hal inilah yang turut mempengaruhi ketelitian metode kertas cakram. Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.55 juga menunjukkan data empirik bahwa konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif dan konsentrasi 60% sebagai konsentrasi optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* pada formulasi kombinasi 1:2:3.

Formulasi kombinasi 2:1:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap bakteri *Bacillus subtilis* secara in vitro disajikan pada Tabel 6.56.

Tabel 6.56 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 2:1:3

Perlakuan Kombinasi Ekstrak 2:1:3	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Chloramfenicol</i> (+)	2.81	2.44	1.97
Aquades (-)	0	0	0
30%	5.50	7.69	9.57
40%	4.78	9.64	4.44
50%	4.35	6.87	5.27
60%	3.60	5.99	4.87
70%	3.75	6.07	3.03
80%	5.50	10.54	6.89

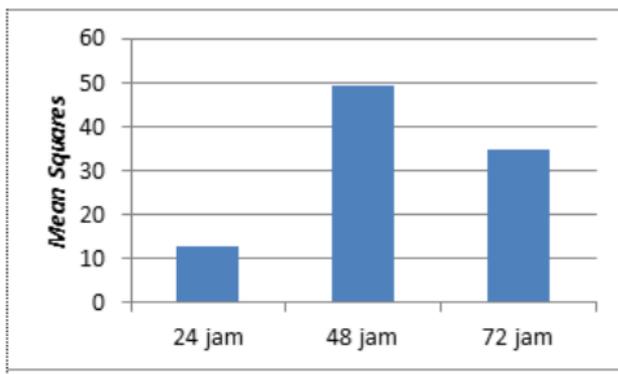
Data formulasi kombinasi 1:2:3 dalam menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis* selanjutnya sebagaimana data perlakuan kombinasi lainnya dilanjutkan dengan analisis varians, dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan penelitian. Data hasil analisis varians satu jalur disajikan pada Tabel 6.57.

Tabel 6.57 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 2:1:3

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	89.904	,000	343.817	,000	243.702	,000
Within Groups	48.361		109.915		44.693	
Total	138.265		453.732		288.395	

Berdasarkan rekapitulasi hasil analisis statistik menunjukkan formulasi kombinasi 2:1:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit berpengaruh signifikan, dibuktikan dengan nilai Sig. $0.000 < 0.01.$, baik pada waktu inkubasi 24 jam, 48 jam, maupun 72 jam. Akan tetapi, jika dilihat dari perbandingan nilai *mean*

squares (Gambar 6.21), masa inkubasi 48 jam memiliki nilai *mean* yang lebih besar dibandingkan waktu inkubasi lainnya.



**Gambar 6.21 Mean Square Formula Kombinasi 2:1:3
*Bacillus subtilis***

Signifikansi formulasi kombinasi ekstrak 2:1:3 dipertegas dengan perbandingan *mean square*. Perbandingan *mean square* memberikan fakta masa inkubasi 72 jam memiliki perbedaan capaian optimalisasi pengaruh variabel jauh lebih besar dibandingkan 24 jam dan 48 jam, sehingga hasilnya dapat dijadikan barometer penentuan konsentrasi yang paling efektif dalam formulasi. Formulasi kombinasi ekstrak 2:1:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit

berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* pada signifikansi 1%, pada waktu perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam (Tabel 6.57). Signifikansi dipertegas dengan perbandingan *mean square* bahwa inkubasi 72 jam lebih besar (Gambar 6.21). Uraian hasil uji Duncan disajikan Tabel 6.58, Tabel 6.59, dan Tabel 6.60.

Tabel 6.58 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 2:1:3 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi 2:1:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01	
		1	2
P2	4	a	
P1	4		b
P6	4		b
P7	4		b
P5	4		b
P4	4		b
P3	4		b
P8	4		b
Sig.		1.000	.026

Perlakuan konsentrasi ekstrak pada formulasi kombinasi 2:1:3 memiliki daya hambat yang sama antar seluruh taraf konsentrasi dan tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb

ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Konsentrasi efektif pada formulasi ini berada pada konsentrasi 30% sedangkan konsentrasi 80% diinterpretasikan sebagai konsentrasi optimum untuk formulasi 2:1:3 dalam menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis* masa inkubasi 24 jam. Pengamatan pada masa inkubasi 48 jam disajikan pada Tabel 6.59.

Tabel 6.59 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 2:1:3 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 2:1:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4	a	b	
P6	4		b	c
P7	4		b	c
P5	4		b	c
P3	4			c
P4	4			c
P8	4			c
Sig.		.120	.012	.012

Pengaruh perlakuan pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam pun memiliki interpretasi yang hampir sama. Terjadi penurunan daya hambat *Chloramfenicol* 0.1%

pada waktu inkubasi 48 jam, yang dibuktikan dengan notasi yang sama antar kontrol positif (P1) dan kontrol negatif (P2). Sebaliknya, tidak ada perbedaan yang signifikan antar taraf perlakuan P5 (50%) dengan seluruh taraf perlakuan konsentrasi lainnya. Hasil uji Duncan 1% (Tabel 6.59) menunjukkan hanya P3, P4, dan P8 yang berbeda secara statistik terhadap kontrol positif, sedangkan konsentrasi lainnya tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Chloramfenicol* 0.1%. Oleh karena konsentrasi 30% tidak berbeda nyata dengan taraf lainnya, maka konsentrasi 30% dapat dinyatakan sebagai konsentrasi yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* masa inkubasi 48 jam, dan konsentrasi optimum ada pada taraf konsentrasi 80%.

Untuk mempertegas hasil pengujian, maka efektifitas senyawa metabolit sekunder dalam formulasi kombinasi 2:3:1 selanjutnya dilakukan pengamatan pada masa inkubasi 72 jam. Pengamatan ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan daya hambat bakteriasida yang terkandung dalam senyawa metabolit

sekunder dalam bahan alam. Data pengamatan untuk masa inkubasi 48 jam disajikan pada Tabel 6.60.

Tabel 6.60 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Bacillus subtilis* Kombinasi 2:1:3 Pada 72 Jam

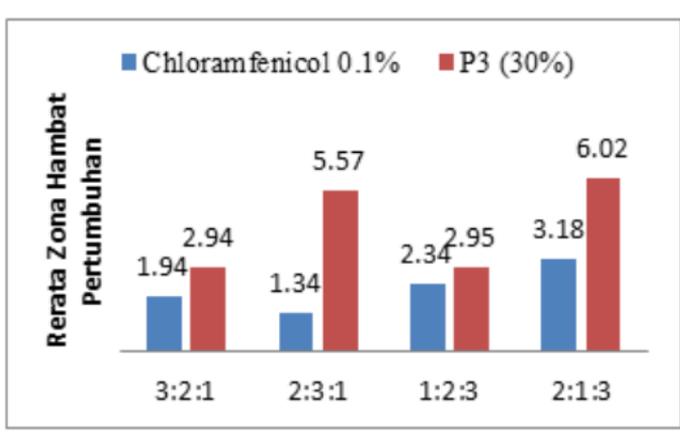
Formulasi Kombinasi 2:1:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.0				
		1	2	3	4	5
P2	4	a				
P1	4	a	b			
P7	4		b	c		
P4	4		b	c	d	
P6	4			c	d	
P5	4			c	d	
P8	4				d	e
P3	4					e
Sig.		.053	.022	.043	.027	.011

Sebagaimana formulasi kombinasi 1:2:3, masa inkubasi 72 jam kontrol positif berupa *Chloramfenicol* 0.1% (P1) untuk formulasi 2:3:1 juga mengalami penurunan daya hambat yang sangat signifikan, dibuktikan dengan notasi yang tidak berbeda dibandingkan kontrol negatif penelitian (P2). Demikian pula dengan konsentrasi yang lebih besar seperti P3

(30%) yang tidak berbeda secara statistik dengan konsentrasi maksimum dalam penelitian P8 (80%). Sebaliknya, P4 tidak berbeda signifikan jika dibandingkan seluruh taraf perlakuan lainnya, P4 hanya berbeda terhadap P3. Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.60 juga menunjukkan data empirik bahwa konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif dan konsentrasi optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* pada formulasi kombinasi 2:1:3. Konsentrasi 40%, 50%, 60%, dan 70% berbeda secara statistik jika dibandingkan dengan konsentrasi minimum penelitian (30%). Hasil analisis statistik ini memberikan informasi bahwa kepekatan konsentrasi belum tentu sejalan dengan daya hambat optimum yang dimiliki oleh bahan alam secara *in vitro*.

Secara keseluruhan formulasi kombinasi ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan pada taraf signifikansi 1% terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*. Perbandingan efektifitas daya bunuh pada masing-masing formulasi kombinasi dapat diketahui dengan membandingkan potensi formulasi kombinasi secara statistik. Perbandingan potensi formulasi kombinasi

ekstrak yang paling potensial dan dapat dijadikan sebagai rekomendasi informasi untuk memperkuat fakta potensinya sebagai antibakteri *Bacillus subtilis*, yang disajikan pada Gambar 6.21.



Gambar 6.22 Perbandingan Kemampuan Penghambatan Pertumbuhan Konsentrasi Ekstrak Efektif Formulasi Kombinasi dengan Kontrol Positif Terhadap *Bacillus subtilis*

Gambar 6.22 memberikan ilustrasi perbandingan daya hambat efektif dari masing-masing formulasi kombinasi ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit. Jika dilihat dari perbandingan konsentrasi efektif dari masing-masing formulasi, maka formulasi 2:1:3 merupakan formula terbaik, dengan daya hambat terbesar dibandingkan dengan formulasi lainnya.

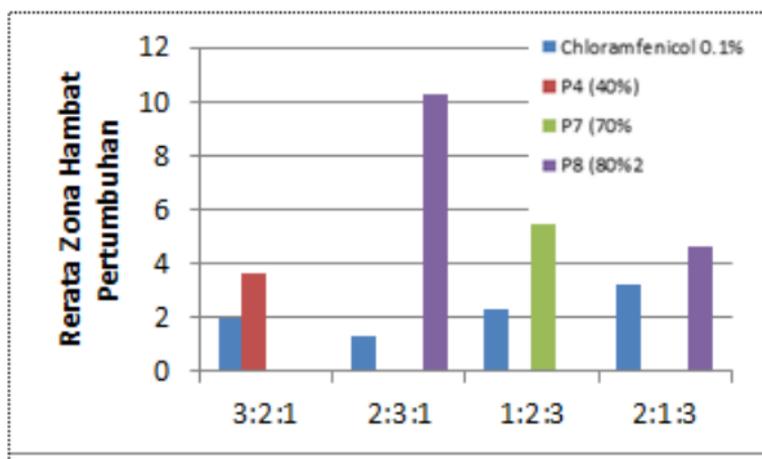
Secara keseluruhan formulasi kombinasi mempunyai daya hambat yang lebih kuat jika dibandingkan dengan kontrol positif, maka potensial dikembangkan sebagai antibakteri berdasarkan rerata zona hambat yang lebih besar dibandingkan antibakteri *Cholamfenicol* 0.1%. Formulasi 2:1:3 memiliki kombinasi rimpang Kunyit yang lebih besar, yaitu 50% dari komposisi seluruhnya. Fakta ini mampu membuktikan potensi rimpang Kunyit sebagai antibakteri *Bacillus subtilis* dalam masa inkubasi 24 jam.

Antibakteri dominan dalam rimpang Kunyit lebih kuat dibandingkan dengan kandungan yang terdapat dalam rimpang Kunyit, jika dilihat dari perbandingan zona hambat dari formulasi 2:3:1 dan formulasi 2:1:3, di mana formulasi 2:1:3 menjadikan kunyit sebagai komposisi utamanya. Formulasi 2:3:1 memiliki komposisi utamanya daun Sembalit Angin, jika dilihat dari zona hambat yang terbentuk, maka formulasi ini cukup baik dibandingkan dengan formulasi 1:2:3 dan 3:2:1 terhadap bakteri *Bacillus subtilis*. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa formulasi kombinasi ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* yang terbaik adalah formulasi kombinasi 2:1:3 dan 2:3:1.

Formulasi kombinasi 2:1:3 mengkombinasikan potensi rimpang Kunyit sebagai komposisi utama, yaitu 50% daun Tambora, 30% daun Sembalit Angin, dan 20% rimpang Kunyit. Sebaliknya, formulasi kombinasi 2:3:1

mengkombinasikan potensi Sembalit Angin sebagai komposisi utama, yaitu 30% daun Tambora, 50% daun Sembalit Angin, dan 20% rimpang Kunyit. Daya hambat yang dimiliki oleh formulasi 2:1:3 dan formulasi 2:3:1 memberikan gambaran potensi kuat daun Sembalit Angin dan rimpang Kunyit sebagai antibakteri *Bacillus subtilis*, dibandingkan formulasi lainnya. Kuat dugaan bahwa kandungan senyawa metabolit sekunder dalam daun Sembalit Angin dan rimpang Kunyit yang lebih kuat dalam menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis* dibandingkan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Indikator zona bening yang terbentuk antara sisi terluar paper disc yang mengandung ekstrak memiliki kemampuan daya hambat paling efektif pada konsentrasi 30%. Konsentrasi ini merupakan konsentrasi paling rendah dalam rentang perlakuan penelitian, tetapi memiliki daya hambat yang berbeda signifikan dibandingkan kontrol positif (*Cholamfenicol* 0.1%). Hal ini membuktikan potensinya sebagai antibakteri.

Efektifitas daya hambat formulasi kombinasi 2:1:3 ekstrak diperkuat dengan perbandingan konsentrasi optimum ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* (Gambar 6.23).



Gambar 6.23 Perbandingan Kemampuan Penghambatan Pertumbuhan Konsentrasi Ekstrak Optimum Formulasi Kombinasi dengan Kontrol Positif Terhadap *Bacillus subtilis*

Perbandingan dari masing-masing formulasi kombinasi yang ditunjukkan Gambar 6.10 memperkuat potensi formulasi kombinasi 2:1:3. Daya hambat optimum yang memiliki zona hambat terbesar dengan konsentrasi terendah ada pada formulasi kombinasi 3:2:1. Data ini memberi interpretasi bahwa dengan konsentrasi 40% formulasi kombinasi 3:2:1 memiliki daya hambat pertumbuhan lebih kuat dibandingkan dengan formulasi lainnya, di mana formulasi 2:3:1, 1:2:3, dan 2:1:3 memiliki daya hambat optimum pada konsentrasi 70% dan 80%.

4. *Candida albicans*

Klasifikasi *Candida albicans* menurut Maulidah, (2017) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Divisi	: Thallophyta
Kelas	: Ascomycetes
Ordo	: Deuteromycetes
Genus	: <i>Candida</i>
Spesies	: <i>Candida albicans</i>

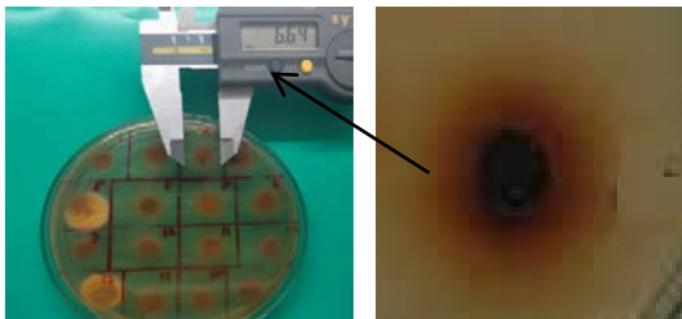
Candida albicans merupakan jamur dimorfik karena memiliki kemampuan untuk tumbuh dalam dua bentuk yang berbeda yaitu sebagai sel tunas yang akan berkembang menjadi blastospora dan menghasilkan kecambah yang akan membentuk hifa semu. Perbedaan dalam bentuk ini tergantung pada faktor eksternal yang mempengaruhinya (Maulidah, 2017).

Candida albicans sering ditemui sebagai penyebab penyakit infeksi pada genetilia dan daerah perigenital wanita. *Candida albicans* merupakan flora normal golongan jamur yang hidup di tubuh manusia seperti di daerah mulut, tenggorokan, vagina dan sistem pencernaan (Maulidah, 2017). *Candida albicans* dalam tubuh manusia

bersifat saprofit dan patogen (Agreta, 2019). *Candida albicans* secara mikroskopis berbentuk bulat, lonjong, atau bulat lonjong, ukuran $2-5 \mu \times 3-6 \mu$ hingga $2-5,5 \mu \times 5-28,5 \mu$, dengan permukaan halus, licin atau berlipat-lipat, berwarna putih kekuning-kuningan dan berbau ragi serta mempunyai struktur dinding sel yang kompleks, tebalnya 100 sampai 400 nm (Maulidah, 2017). *Candida albicans* dapat tumbuh pada pH 4,5-6,5 dan pada suhu 28°C - 37°C (Nuryati dan Huwaina, 2016). Penyakit yang disebabkan oleh *Candida albicans* disebut kandidiasis. Kandidiasis merupakan suatu penyakit jamur yang bersifat akut dan sub akut yang disebabkan oleh spesies *Candida* sp, biasanya oleh *Candida albicans* (Farizal *et al.*, 2017). Penyakit yang ditimbulkan oleh jamur ini ditemukan di seluruh dunia dan dapat menyerang semua umur, baik laki-laki maupun perempuan (Permatasari dan Sari, 2019).

Potensi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit sebagai antibakteri penyebab infeksi post partum dilakukan pula pada pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro*. Pengukuran pertumbuhan *Candida albicans* berdasarkan hasil pengukuran diameter zona bening antara ekstrak dengan

sisi terluar zona bening, di mana zona bening merupakan parameter daya hambat pertumbuhan *Bacillus subtilis* secara in vitro, sebagaimana tampak pada Gambar 6.24.



**Gambar 6.24 Pengukuran Zona Hambat
Pertumbuhan *Candida albicans***

Formulasi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit disusun dalam 4 formulasi kombinasi, daun Tambora : daun Sembalit Angin : rimpang Kunyit, juga disusun formulasi dan konsentrasi yang sama dengan perlakuan pada *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Potensi formulasi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap *Candida albicans* secara in vitro, disajikan pada Tabel 6.61

Tabel 6.61 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 3:2:1

Perlakuan Kombinasi Ekstrak 3:2:1	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Albothyl</i> (+)	3.98	3.30	1.57
Aquades (-)	0	0	0
30%	2.50	2.78	3.38
40%	2.31	3.35	3.68
50%	2.42	4.76	5.49
60%	2.53	3.61	4.10
70%	2.24	4.13	4.75
80%	2.97	3.05	4.09

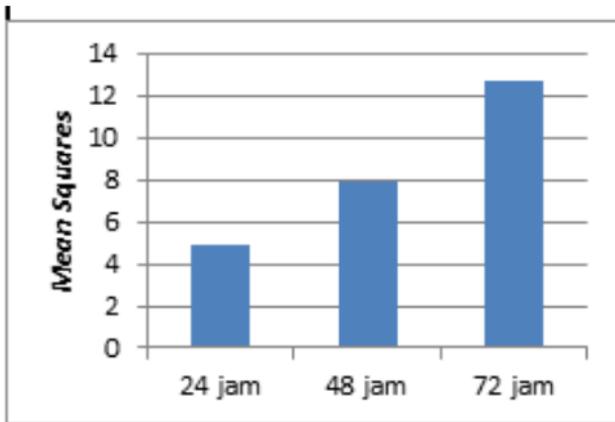
Keseluruhan data pada formulasi kombinasi 3:2:1 dianalisis statistik Anava satu jalur dan dilanjutkan uji Duncan 1% untuk mengetahui konsentrasi optimal dan efektif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. Mikroorganisme ini merupakan salah satu kelompok khamir yang sangat potensial dan erat aitananya dengan infeksi sistem reproduksi. Mikroorganisme ini bersifat saprofit sehingga dalam kondisi lingkungan pH dan kelembaban yang sesuai dengan pertumbuhan, akan cenderung patogenik dan menimbulkan peradangan dan

infeksi. Formulasi kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit dalam formulasi 3:2:1 terhadap pertumbuhan *Candida albicans* dianalisis sebagai berikut:

Tabel 6.62 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 3:2:1

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	34.489	,000	55.548	,000	88.474	,000
Within Groups	20.087		18.356		24.451	
Total	54.576		73.903		112.925	

Signifikansi dari hasil uji statistik ANAVA didukung dengan dengan perbandingan *mean square error* (MSE) atau *mean squared deviation* (MSD) merupakan suatu estimasi atau perkiraan kuantitas yang tidak teramati, di mana rerata kuadrat kesalahan diukur. Pengamatan dilakukan pada masa inkubasi 24 jam, 48 jam, dan 72 jam, di mana masa inkubasi 72 jam memiliki nilai *mean square* lebih besar dibandingkan 24 jam dan 48 jam (Gambar 6.25).



**Gambar 6.25 Mean Square Formulasi Kombinasi 3:2:1
*Candida albicans***

Data rekapitulasi pada Tabel 6.2 diketahui bahwa hasil analisis variansi perlakuan ekstrak kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan *Candida albicans* pada signifikansi 1%, pada waktu perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Diagram perbandingan *mean square* mempertegas signifikansi pengaruh formulasi 3:2:1, dimana masa inkubasi 72jam memiliki nilai *mean square* lebih besar. Konsentrasi optimal dan efektif ekstrak, dijelaskan pada Tabel 6.63, Tabel 6.64, dan Tabel 6.65.

Tabel 6.63 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 3:2:1 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.0	
		1	2
P2	4	a	
P7	4		b
P4	4		b
P5	4		b
P3	4		b
P6	4		b
P8	4		b
P1	4		b
Sig.		1.000	.026

Berdasarkan hasil dari uji Duncan 1%, seluruh taraf konsentrasi pada formulasi kombinasi 3:2:1 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), dalam arti bahwa pada konsentrasi tsb memiliki kemampuan yang sama dengan *Albothyl* 0.25%, sebaliknya konsentrasi tersebut berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan kontrol negatif (P2). Akan tetapi, rerata zona hambat Tabel 6.63 memberikan gambaran P1 (*Albothyl* 0.25%) lebih baik dibandingkan taraf konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, dan 80%. Hal ini dapat diinterpretasikan pada formulasi kombinasi 3:2:1 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit tidak lebih baik pengaruhnya

dibandingkan daya hambat *Albothyl* 0.25%. Oleh karena tidak ada perbedaan secara statistik pada seluruh taraf konsentrasi, maka konsentrasi 30% dapat disimpulkan sebagai konsentrasi yang efektif dan optimum masih dimiliki oleh *Albothyl* 0.25% dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada formulasi kombinasi 3:2:1 masa inkubasi 24 jam.

Tabel 6.64 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 3:2:1 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 3:2:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P3	4		b	
P8	4		b	c
P1	4		b	c
P4	4		b	c
P6	4		b	c
P7	4		b	c
P5	4			c
Sig.		1.000	.063	.021

Hasil dari uji Duncan 1%, bahwa perlakuan antar P3, P4, P6, P7, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), dalam arti bahwa pada konsentrasi tsb tetap memiliki kemampuan yang sama dengan *Albothyl* 0.25%. Tetapi konsentrasi 30% berbeda

signiifikan terhadap P5. sehingga P5 diinterpretasikan sebagai konsentrasi optimum, sedangkan konsentrasi efektif ada pada taraf 40% dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada formulasi kombinasi 3:2:1 masa inkubasi 48 jam.

Tabel 6.65 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 3:2:1 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 3:2:1	Notasi Subset for alpha = 0.01			
	N	1	2	3
P2	4	a		
P1	4	a	b	
P3	4		b	c
P4	4			c
P8	4			c
P6	4			c
P7	4			c
P5	4			c
Sig.		.038	.018	.014

Taraf P3,tidak berbeda signifikan dengan P4, P5, P6, P7 dan P8, tetapi P3 tidak berbeda signifikan terhadap kontrol positif (P1). Tabel 6.65 menunjukkan bahwa terjadi penurunan daya hambat *Albothyl* 0.25% pada masa inkubasi 72 jam, karena *Albothyl* 0.25% dinyatakan setara dengan kontrol negatif dan konsentrasi minimum 30%.

Data ini mempertegas bahwa konsentrasi 40% merupakan konsentrasi yang efektif dan dan konsentrasi 50% sebagai konsentrasi optimum dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada formulasi kombinasi 3:2:1.

Formulasi kombinasi 2:3:1 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap *Candida albicans* secara in vitro (Tabel 6.66).

Tabel 6.66 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 2:3:1

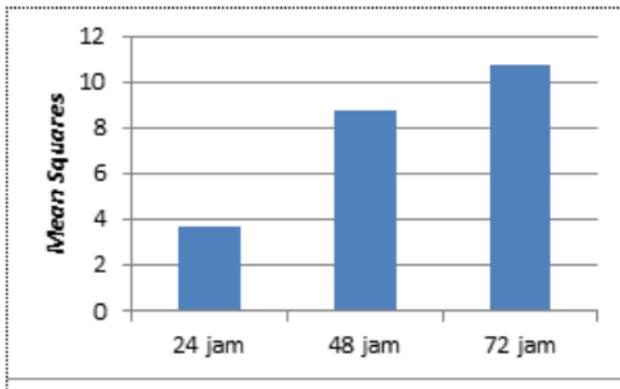
Perlakuan Kombinasi Ekstrak 2:3:1	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Albothyl</i> 0.25% (+)	2.85	2.30	1.72
Aquades (-)	0	0	0
30%	1.69	3.52	4.32
40%	2.37	4.19	4.32
50%	2.76	4.58	4.69
60%	1.95	3.99	4.18
70%	2.78	4.03	4.13
80%	2.72	3.14	3.22

Hasil analisis data formulasi kombinasi 2:3:1 dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* disajikan pada Tabel 6.67.

Tabel 6.67 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 2:3:1

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	25.979	,000	61.413	,000	75.453	,000
Within Groups	16.046		15.703		14.155	
Total	42.025		77.115		89.608	

Data hasil analisis statistik ANAVA di atas didukung dengan dengan perbandingan *mean square* dalam bentuk diagram pada Gambar 6.26.



Gambar 6.26 Mean Square Formula Kombinasi 2:3:1 *Candida albicans*

Data rekapitulasi pada Tabel 6.67 diketahui bahwa hasil analisis variansi perlakuan ekstrak kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan *Candida albicans* pada signifikansi 1%, pada waktu perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Gambar 6.26 disajikan dalam bentuk diagram perbandingan *mean square* mempertegas signifikansi bahwa nilai *means square* untuk formulasi 2:3:1 masa inkubasi 72 jam lebih besar. Konsentrasi optimal dan efektif ekstrak, pada Tabel 6.68, Tabel 6.69, dan Tabel 6.70.

Tabel 6.68 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 2:3:1 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi	N	Notasi Subset for alpha = 0.01	
		1	2
2:1:3			
P2	4	a	
P3	4		b
P6	4		b
P4	4		b
P8	4		b
P5	4		b
P7	4		b
P1	4		b
Sig.		1,000	,244

Formulasi kombinasi 3:2:1 dan 2:3:1 memiliki hasil analisis yang sama (Tabel 6.68). Tidak ada perbedaan yang signifikan seluruh taraf konsentrasi terhadap kontrol positif (P1), dalam arti bahwa pada konsentrasi tsb memiliki kemampuan yang sama dengan *Albothyl* 0.25%, sebaliknya konsentrasi tersebut berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan kontrol negatif (P2). Akan tetapi, rerata zona hambat Tabel 6.68 memberikan gambaran P1 (*Albothyl* 0.25%) lebih baik dibandingkan taraf konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, dan 80%. Hal ini dapat diinterpretasikan pada formulasi kombinasi 2:3:1 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit tidak lebih baik pengaruhnya dibandingkan daya hambat *Albothyl* 0.25%. Oleh karena tidak ada perbedaan secara statistik pada seluruh taraf konsentrasi, maka konsentrasi 30% dapat disimpulkan sebagai konsentrasi yang efektif dan optimum masih dimiliki oleh *Albothyl* 0.25% dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada formulasi kombinasi 2:3:1 masa inkubasi 24 jam.

Kesamaan hasil dari kedua formulasi kombinasi dipengaruhi oleh komposisi dominan pada masing-masing formulasi kombinasi. Pada formulasi 3:2:1 menggunakan daun Tambora sebagai komposisi utama, sedangkan formulasi 2:3:1 menggunakan daun Sembalit Angin sebagai komponen utamanya, yaitu sebesar 50%. Hasil

analisis statistik ini memberikan penjelasan bahwa daun Tambora dan daun Sembalit Angin memiliki respon daya hambat yang hampir sama terhadap pertumbuhan *Candida albicans* pada masa inkubasi 24 jam.

Tabel 6.69 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 2:3:1 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 2:3:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4		b	
P8	4		b	c
P3	4		b	c
P6	4		b	c
P7	4		b	c
P4	4			c
P5	4			c
Sig.		1.000	.011	.034

Pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam memiliki interpretasi yang hampir sama, di mana hasil uji Duncan 1% (Tabel 6.69) menunjukkan perlakuan P7 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1) dan juga seluruh konsentrasi lainnya, sehingga penafsiran perbandingan terhadap daya hambat senyawa metabolit sekunder pada formulasi 2:3:1 yang dimiliki konsentrasi tsb dapat

dianggap setara dengan *Albothyl* 0.25%. Konsentrasi P5 (50%) tidak berbeda signifikan terhadap seluruh taraf konsentrasi, sebaliknya konsentrasi 50% berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kontrol positif. Demikian pula dengan konsentrasi efektif ada pada taraf 30% dan konsentrasi optimum ada pada taraf 50% pada masa inkubasi 48 jam.

Tabel 6.70 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 2:3:1 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 2:3:1	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4		b	
P8	4		b	c
P7	4			c
P6	4			c
P3	4			c
P4	4			c
P5	4			c
Sig.		1.000	.011	.023

Pengamatan pada masa inkubasi 72 jam (Tabel 6.70) kontrol positif berupa *Albothyl* 0.25% (P1) mengalami penurunan daya hambat yang sangat signifikan,

dibuktikan dengan notasi yang berbeda dibandingkan taraf konsentrasi bahan alam lainnya, kecuali konsentrasi 80%. Konsentrasi 80% merupakan konsentrasi yang paling pekat, tetapi zona hambat yang dimiliki tidak berbeda signifikan terhadap taraf lainnya. Hal ini diduga disebabkan penyerapan ekstrak dengan konsentrasi lebih pekat tidak maksimal dibandingkan konsentrasi yang lebih rendah. Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.70 menunjukkan data empirik bahwa konsentrasi 50% merupakan konsentrasi yang efektif dan konsentrasi 50% merupakan konsentrasi yang mempunyai daya hambat optimum terhadap pertumbuhan *Candida albicans* pada formulasi kombinasi 2:3:1.

Konsentrasi efektif dan optimum penghambatan pertumbuhan *Candida albicans* formulasi kombinasi 3:2:1 dan 2:3:1 hampir sama, di mana komposisi daun Tambora dan daun Sembalit Angin memiliki bahan utama campuran. Hal ini memberikan gambaran potensi bahan alam tersebut yang dapat dipahami memiliki potensi yang hampir setara dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. Selanjutnya, untuk formulasi kombinasi 1:2:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap *Candida albicans* secara in vitro disajikan pada Tabel 6.71.

Tabel 6.71 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 1:2:3

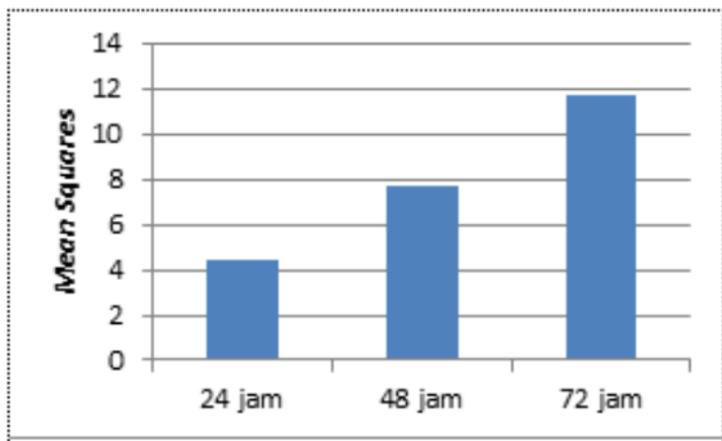
Perlakuan Kombinasi Ekstrak 1:2:3	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Albothyl</i> 0.25% (+)	2.34	2.21	1.92
Aquades (-)	0	0	0
30%	3.04	4.51	4.81
40%	3.23	3.18	3.54
50%	2.71	3.21	3.43
60%	3.21	3.68	4.10
70%	2.28	3.96	5.3
80%	2.02	3.32	4.19

Data formulasi kombinasi 1:2:3 dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada Tabel 6.71 selanjutnya dilanjutkan dengan analisis varians, dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan penelitian. Formulasi kombinasi 1:2:3 menekankan pada kombinasi rimpang kunyit sebagai komponen kombinasi yang paling dominan, yang nantinya akan diketahui perbandingan respon daya hambat pertumbuhan *Candida albicans* yang lebih baik. Data hasil analisis varians satu jalur disajikan pada Tabel 6.72.

Tabel 6.72 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 1:2:3

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	30.997	,000	53.808	,000	81.892	,000
Within Groups	20.311		15.279		13.699	
Total	51.308		69.087		95.591	

Nilai *mean square* dalam bentuk diagram pada Gambar 6.7 memperkuat data hasil analisis pada Tabel 6.72.



Gambar 6.27 Mean Square Formula Kombinasi 1:2:3 *Candida albicans*

Formulasi kombinasi ekstrak 1:2:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan terhadap zona hambat pertumbuhan *Candida albicans* pada signifikansi 1%, pada waktu perlakuan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam (Tabel 6.72). Signifikansi dipertegas dengan perbandingan *mean square* bahwa inkubasi 72 jam lebih besar (Gambar 6.27). Data uji lanjut Duncan selanjutnya disajikan pada Tabel 6.73, Tabel 6.74, dan Tabel 6.75.

Tabel 6.73 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 1:2:3 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi	N	Notasi Subset for alpha = 0.01	
		1	2
2:1:3			
P2	4	a	
P8	4		b
P7	4		b
P1	4		b
P5	4		b
P3	4		b
P6	4		b
P4	4		b
Sig.		1.000	.115

Perlakuan konsentrasi ekstrak pada formulasi kombinasi 1:2:3 memiliki daya hambat yang hampir sama antar masing-masing konsentrasi. Hasil dari uji Duncan

1% Tabel 6.13 menunjukkan perlakuan P3, P4, P5, P6, dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Albothyl* 0.25%. Oleh karena tidak terdapat perbedaan signifikan antara konsentrasi 70% (P7) dibandingkan dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, dan 80%, maka konsentrasi 30% dapat dinyatakan konsentrasi yang efektif, dan konsentrasi 40% diinterpretasikan sebagai konsentrasi optimum untuk formulasi 1:2:3 dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* masa inkubasi 24 jam. Rendahnya daya hambat konsentrasi yang lebih pekat dibandingkan konsentrasi yang lebih encer ada kemungkinan dipengaruhi faktor-faktor teknis, seperti penyiapan dan preparasi pengenceran yang kurang sempurna. Kemungkinan lainnya adalah keterbatasan penyerapan paper disc pada metode kertas cakram dalam menyerap ekstrak yang kurang maksimal, sehingga menunjukkan pengaruh daya hambat yang kurang maksimal pula.

Efektifitas senyawa metabolit sekunder dalam formulasi kombinasi 1:2:3 selanjutnya dilakukan pengamatan pada masa inkubasi 48 jam dan 72 jam. Pengamatan ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan daya hambat senyawa metabolit sekunder dalam bahan alam.

Tabel 6.74 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 1:2:3 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01		
		1	2	3
P2	4	a		
P1	4		b	
P4	4		b	c
P5	4		b	c
P8	4		b	c
P6	4		b	c
P7	4		b	c
P3	4			c
Sig.		1.000	.010	.046

Pengaruh perlakuan pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam pun memiliki interpretasi yang hampir sama. Hasil uji Duncan 1% (Tabel 6.14) menunjukkan perlakuan perlakuan P3, P4, P5, P6, P7 dan P8 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Albothyl* 0.25%. Kontrol positif hanya berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan P3 (30%) Oleh karena itu, konsentrasi 30% dinyatakan konsentrasi yang efektif dan optimum dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* masa inkubasi 48 jam,

Tabel 6.75 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 1:2:3 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 1:2:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.0			
		1	2	3	4
P2	4	a			
P1	4		b		
P5	4			c	
P4	4			c	
P6	4			c	d
P8	4			c	d
P3	4			c	d
P7	4				d
Sig.		1.000	1.000	.028	.048

Masa inkubasi 72 jam (Tabel 6.75) kontrol positif berupa *Albothyl* 0.25% (P1) mengalami penurunan daya bunuh yang sangat signifikan, dibuktikan dengan notasi yang berbeda nyata dibandingkan seluruh taraf konsentrasi. Bahkan ekstrak kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit memiliki rerata zona hambat yang lebih baik dibandingkan *Albothyl* 0.25%. Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.75 menunjukkan data empirik bahwa konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif dan konsentrasi 70% sebagai konsentrasi optimum dalam menghambat

pertumbuhan *Candida albicans* pada formulasi kombinasi 1:2:3.

Formulasi kombinasi 2:1:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit terhadap *Candida albicans* secara in vitro disajikan pada Tabel 6.76.

Tabel 6.76 Rekapitulasi Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 2:1:3

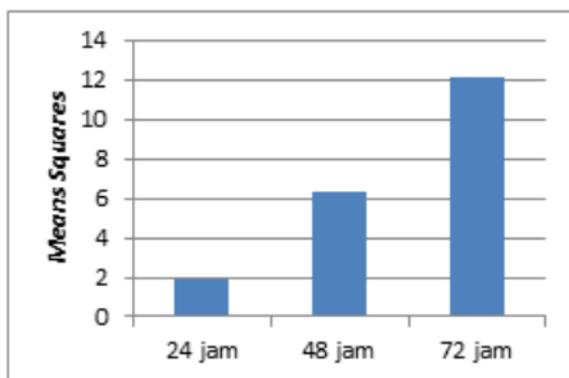
Perlakuan Kombinasi Ekstrak 2:1:3	Rerata Zona Hambat ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
<i>Albothyl</i> 0.25% (+)	1.90	1.86	2.10
Aquades (-)	0	0	0
30%	1.40	2.77	3.39
40%	2.26	3.64	4.73
50%	1.76	3.38	4.51
60%	1.31	3.88	3.30
70%	1.66	2.29	2.64
80%	1.93	1.93	5.53

Data formulasi kombinasi 1:2:3 dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada Tabel 6:76 selanjutnya sebagaimana data perlakuan kombinasi lainnya dilanjutkan dengan analisis varians, dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan penelitian. Data hasil analisis varians satu jalur disajikan pada Tabel 6.77.

Tabel 6.77 Rekapitulasi Hasil Analisis Varians Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 2:1:3

	24 jam		48 jam		72 jam	
	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.	Sum of Squares	Sig.
Between Groups	13.186	,000	44.274	,000	84.962	,000
Within Groups	9.937		10.809		21.866	
Total	23.123		55.083		106.828	

Berdasarkan rekapitulasi hasil analisis statistik menunjukkan formulasi kombinasi 2:1:3 daun Tambora, daun Sembalit Angin, rimpang Kunyit berpengaruh signifikan, dibuktikan dengan nilai Sig. $0.000 < 0.01$.



Gambar 6.28 Mean Square Formula Kombinasi 2:1:3 *Candida albicans*

Signifikansi formulasi kombinasi ekstrak 2:1:3 dipertegas dengan perbandingan *mean square*. Masa inkubasi 72 jam memiliki perbedaan capaian optimalisasi pengaruh variabel yang lebih kuat dibandingkan 24 jam dan 48 jam, sehingga hasilnya dapat dijadikan barometer penentuan konsentrasi yang paling efektif dalam formulasi (Gambar 6.28). Uji Duncan 1% bertujuan untuk mengetahui perbedaan pengaruh variabel independen antar taraf perlakuan terhadap variabel dependen penelitian secara statistik, sehingga dapat mengetahui efektifitas dan optimalitas perlakuan. Uraian hasil uji Duncan disajikan Tabel 6.78, Tabel 6.79, dan Tabel 6.80.

Tabel 6.78 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 2:1:3 Pada 24 Jam

Formulasi Kombinasi 2:1:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.01	
		1	2
P2	4	a	
P6	4		b
P3	4		b
P7	4		b
P5	4		b
P1	4		b
P8	4		b
P4	4		b
Sig.		1.000	.080

Perlakuan konsentrasi ekstrak pada formulasi kombinasi 2:1:3 memiliki daya hambat yang sama antar seluruh taraf konsentrasi dan tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Albothyl* 0.25%. Konsentrasi efektif pada formulasi ini berada pada konsentrasi 30% sedangkan konsentrasi 40% diinterpretasikan sebagai konsentrasi optimum untuk formulasi 2:1:3 dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* masa inkubasi 24 jam. Pengamatan pada masa inkubasi 48 jam disajikan pada Tabel 6.79

Tabel 6.79 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 2:1:3 Pada 48 Jam

Formulasi Kombinasi 2:1:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.0			
		1	2	3	4
P2	4	a			
P1	4		b		
P8	4		b		
P7	4		b	c	
P3	4		b	c	d
P5	4			c	d
P4	4			c	d
P6	4				d
Sig.		1.000	.093	.014	.039

Pengaruh perlakuan pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam pun memiliki interpretasi yang hampir sama. Hasil uji Duncan 1% (Tabel 6.79) menunjukkan taraf konsentrasi P3, P6, dan P7 tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (P1), sehingga konsentrasi tsb ditafsirkan memiliki kemampuan yang sama dengan *Albothyl* 0.25%. Akan tetapi konsentrasi tersebut berbeda signifikan jika dibandingkan dengan P4 dan P5. Taraf konsentrasi P3 (30% sebagai konsentrasi minimum memiliki daya hambat yang tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan seluruh taraf konsentrasi, kecuali dengan konsentrasi 80%. Oleh karena itu, konsentrasi 30% dinyatakan konsentrasi yang efektif dan konsentrasi 80% dinyatakan sebagai konsentrasi optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Candida albicans* masa inkubasi 48 jam.

Meskipun zona hambat yang dihasilkan konsentrasi minimum (30%) cukup efektif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*, tetapi rerata zona hambat yang terbesar dihasilkan oleh konsentrasi 60%, sehingga konsentrasi tersebut dinyatakan sebagai konsentrasi optimum. Sementara konsentrasi efektif dimaknai sebagai konsentrasi yang memiliki daya hambat yang sama kuat, tetapi dengan konsentrasi yang paling terendah.

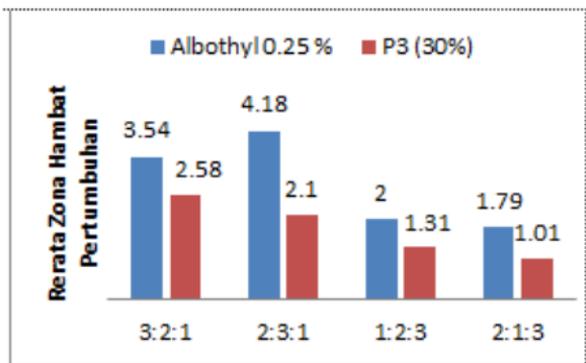
Tabel 6.80 Hasil Uji Duncan 1% Zona Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* Kombinasi 2:1:3 Pada 72 Jam

Formulasi Kombinasi 2:1:3	N	Notasi Subset for alpha = 0.0				
		1	2	3	4	5
P2	4	a				
P1	4		b			
P7	4		b	c		
P6	4		b	c	d	
P3	4		b	c	d	
P5	4			c	d	e
P4	4				d	e
P8	4					e
Sig.		1.000	.092	.017	.062	.165

Sebagaimana formulasi kombinasi 1:2:3, masa inkubasi 72 jam kontrol positif berupa *Albothyl* 0.25% (P1) untuk formulasi 2:3:1 juga mengalami penurunan daya hambat yang sangat signifikan, dibuktikan dengan notasi yang tidak berbeda dibandingkan beberapa taraf konsentrasi pekat yang memiliki daya hambat rendah, seperti P6, dan P7. Kendati demikian, P3 (30%) tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan taraf konsentrasi yang lebih rendah, dan juga yang lebih tinggi, kecuali taraf konsentrasi 80%. Konsentrasi yang lebih

pekat pada formulasi 2:1:3 juga mempunyai daya hambat yang tidak lebih baik dibandingkan konsentrasi yang lebih rendah (40% dan 50%), sebagaimana formulasi yang lain. Hasil uji Duncan 1% pada Tabel 6.80 juga menunjukkan data empirik bahwa konsentrasi 30% merupakan konsentrasi yang efektif dan konsentrasi optimum pada taraf 80% dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada formulasi kombinasi 2:1:3.

Secara keseluruhan formulasi kombinasi ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit berpengaruh signifikan pada taraf signifikansi 1% terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. Perbandingan efektifitas daya hambat pada masing-masing formulasi kombinasi dapat diketahui dengan membandingkan potensi formulasi kombinasi secara statistik. Perbandingan potensi formulasi kombinasi ekstrak yang paling potensial dan dapat dijadikan sebagai rekomendasi informasi lebih lanjut, disajikan pada Gambar 6.29. Perbandingan daya hambat *Albothyl* 0.25% sebagai kontrol positif yang dibandingkan dengan daya hambat perlakuan, dengan tujuan untuk mengetahui perbandingan daya hambat antara zat sintetik (*Albothyl* 0.25%) dengan bahan alam.



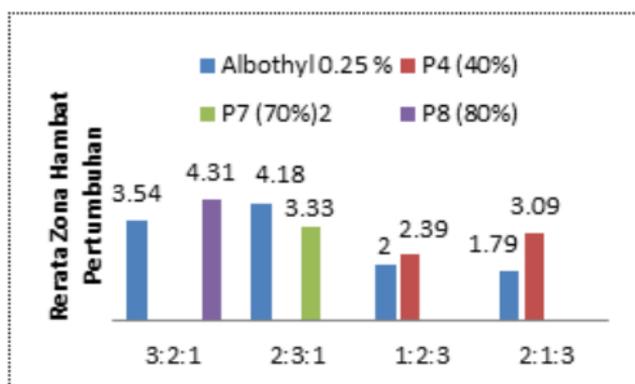
Gambar 6.29 Perbandingan Kemampuan Penghambatan Pertumbuhan Konsentrasi Ekstrak Efektif Formulasi Kombinasi dengan Kontrol Positif Terhadap *Candida albicans*

Gambar 6.29 memberikan ilustrasi perbandingan daya hambat efektif dari masing-masing formulasi kombinasi ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit. Jika dilihat dari perbandingan konsentrasi efektif dari masing-masing formulasi, maka seluruh formulasi kombinasi memiliki daya hambat yang jauh lebih rendah dibandingkan daya hambat *Albothyl* 0.25% sebagai kontrol positif. Interpretasi ini dapat dijelaskan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam bahan alam dengan variasi formulasi kombinasi masih belum dapat melebihi daya hambat zat sintetik *Albothyl* 0.25% sebagai kontrol positif. Gambar

6.29 tampak formulasi kombinasi 3:2:1 memiliki rerata daya hambat konsentrasi efektif lebih besar (2.58) dibandingkan formulasi lainnya pada masa inkubasi 24 jam, meskipun tidak lebih besar dibandingkan *Albothyl* 0.25%. Hasil ini membuktikan potensi daun Tambora sebagai antifungi *Candida albicans* dalam masa inkubasi 24 jam, meskipun tidak lebih baik dibandingkan antibakteri *Albotyl*.

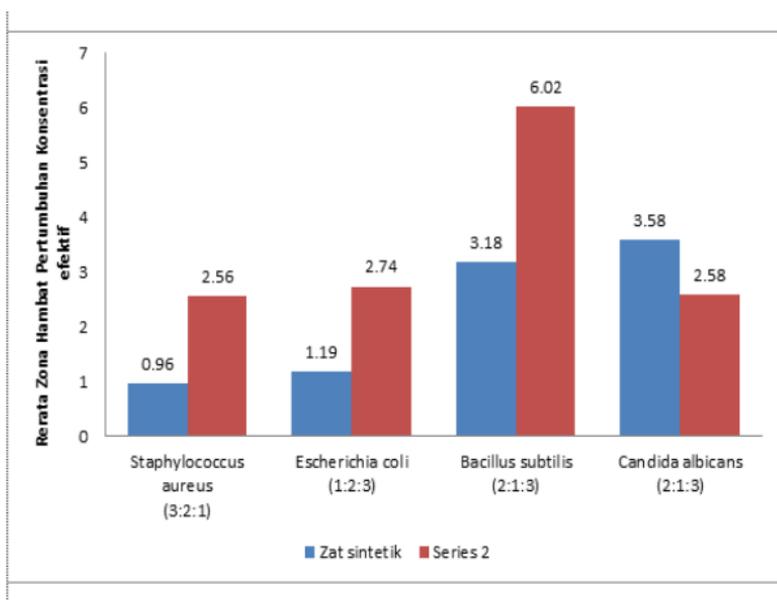
Antifungi dominan dalam daun Tambora dan daun Sembalit Angin lebih kuat dibandingkan dengan kandungan yang terdapat dalam rimpang Kunyit, jika dilihat dari perbandingan zona hambat dari seluruh formulasi. Formulasi kombinasi 3:2:1 dan formulasi 2:3:1 yang menjadikan daun Tambora dan daun Sembalit Angin sebagai komposisi utamanya, menunjukkan rerata daya hambat konsentrasi efektif yang lebih besar dibandingkan formulasi kombinasi 1:2:3 dan 2:1:3 yang memiliki kandungan daun Tambora lebih rendah dan rimpang Kunyit lebih besar. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa formulasi kombinasi ekstrak daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* yang terbaik adalah formulasi kombinasi 3:2:1.

Formulasi kombinasi 3:2:1 mengombinasikan potensi daun Tambora sebagai komposisi utama, yaitu 50% daun Tambora, 30% daun Sembalit Angin, dan 20% rimpang Kunyit. Indikator zona bening yang terbentuk antara sisi terluar paper disc yang mengandung ekstrak memiliki kemampuan daya hambat paling efektif pada konsentrasi 30%, meskipun memiliki daya hambat yang lebih rendah dibandingkan *Albothyl* 0.25%. Hal ini membuktikan potensinya sebagai antifungi masih relatif lebih rendah. Data diperkuat dengan perbandingan konsentrasi optimum ekstrak dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* (Gambar 6.30).



Gambar 6.30 Perbandingan Kemampuan Penghambatan Pertumbuhan Konsentrasi Ekstrak Optimum Formulasi Kombinasi dengan Kontrol Positif Terhadap *Candida albicans*

Daya hambat optimum yang memiliki zona hambat terbesar dengan konsentrasi terendah ada pada formulasi kombinasi 1:2:3 dan 2:1:3. Data ini memberi interpretasi bahwa dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dengan maksimal membutuhkan konsentrasi yang lebih besar, sehingga dapat menyamai daya hambat zat sintetik dalam *Albothyl* 0.25%



Gambar 6.30 Potensi formulasi kombinasi sebagai antimikroba

Perbandingan potensi dari keseluruhan formulasi kombinasi pada Gambar 6.30 dapat dijelaskan kombinasi

terbaik pada konsentrasi efektif daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit. Formulasi kombinasi terbaik ada pada formulasi 3:2:1 terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (2.56), formulasi kombinasi 1:2:3 terhadap *Escherichia coli* (2.74), formulasi kombinasi 2:1:3 terhadap *Bacillus aureus* (6.02), dan formulasi 2:1:3 terhadap *Candida albicans* (2.58).

Kombinasi daun Tambora, daun Sembalit Angin, dan rimpang Kunyit dapat dijelaskan secara *in vitro* lebih efektif sebagai antibakteri, dibandingkan antifungi. Daya hambat ekstrak kombinasi lebih baik dibandingkan senyawa sintetik *Chloramfenicol* 0.1%, tetapi lebih rendah dibandingkan *Albothyl* 0.25%. Hal ini yang menegaskan fungsinya sebagai antibakteri. Daun Tambora mengandung mengandung senyawa asam amino, organacid, pectic substance, minyak astiri kumarin, ageratochromene, friedelin, β -sitosterol, flavonoid, saponin, stigmasterol, tannin, sulfur, dan potasium chlorida, minyak astiri, alkaloid, dan kumarin. Kandungan senyawa aktif yang ada pada daun tambora diketahui mengandung metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, kromen, kromon, benzofuran,

kumarin, minyak astiri, sterol, dan tannin (Amin, M. R., 2019 : 26-27). Sejalan dengan hal itu, formulasi antibakteri dalam daun Tambora dikombinasikan dengan daun Sembalit Angin yang mengandung senyawa kimia yang terdiri dari alkaloid, saponin, glikosida, flavonoid, dan tannin (Garvita, 2017: 54). Senyawa kimia dalam formulasi tersebut dilengkapi dengan rimpang Kunyit, yang mengandung minyak astiri yang terdiri dari alpha dan beta tumerone, aril-tumeron, artumerone, alpha dan beta atlantone, kurlon kurkumol, zingiberen, bisabolen, seskuifellandren, aril kurkumen, humulen. Kukuminoid terdiri dari kurkumin, dimetoksi kurkuin, desmetoksirkurkumin, bisdemetoksi kurkumin, dihidrokurkumin, natrium kurkuminat (NaC), diasetil kurkumin (DAC), trietil kurkumin (TEC), tetra hidro kurkumin (THC), asam ferulat (FA). Arbinosa, fruktosa, pati, tanin, dan damar (Sani, dkk., 2019 : 10).

Senyawa metabolit aktif alkaloid diketahui bekerja sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri. Terganggunya penyusun peptidoglikan sel bakteri menyebabkan lapisan dinding sel rusak, akibatnya terjadilah kematian sel atau nekrosis. Flavonoid dalam metabolit sekunder tanaman

juga berfungsi sebagai antibakteri, yaitu membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri yang diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Senyawa intraseluler yang terdorong keluar sel mengakibatkan pecahnya selaput atau membran plasma, yang dalam waktu inkubasi tertentu mengakibatkan kematian sel.

Daya antibakteri dari tanin diprediksi menyebabkan turunnya permeabilitas dan turgositas sel bakteri, sehingga dinding sel mengkerut. Turunya turgositas sel akan mengganggu permeabilitas sel itu sendiri dan menyebabkan kerusakan dinding sel (Dwidjoseputro, 2003). Daun Tambora dan daun Sembalit Angin memiliki alkaloida, flavonoid, dan tannin dalam jumlah dominan, sehingga memperkuat potensinya sebagai antibakteri dalam komposisi dominan. Mekanisme kerja terganggunya permeabilitas dinding sel umumnya melibatkan peran senyawa metabolit terpenoid, karena terpenoid juga berperan sebagai antibakteri. Terpenoid diduga terlibat dalam kerusakan membran senyawa lipofilik. Terpenoid reaktif terhadap protein transmembran atau porin pada membran ekstraseluler sel bakteri. Interaksi ini membentuk ikatan polimer yang kuat,

akibatnya porin mengalami kerusakan yang pada akhirnya berdampak pada turunnya permeabilitas dinding sel bakteri. Jika permeabilitas sel terganggu, maka nutrisi yang dibutuhkan dalam pertumbuhan sel bakteri juga terganggu. Pada masa inkubasi tertentu, sel bakteri akan mengalami penghambatan pertumbuhan, dengan ditandai terbentuknya zona hambat secara *in vitro*.

Potensi antibakteri daun TAMBORA dan Sembalit Angin dalam komposisi dominan juga dipengaruhi oleh steroid. Berbagai referensi menegaskan bahwa mekanisme kerja steroid lebih kuat sebagai antibakteri, yang juga bekerja reaktif pada pengrusakan membran sel bakteri (Monalisa, *et al.*, 2011).

Senyawa metabolit dalam Kunyit seperti curcumin dan minyak atsiri diketahui juga potensial sebagai antibakteri, karena adanya gugus fungsi hidroksil dan karbonil yang merupakan turunan fenol. Turunan fenol inilah yang jugabersinergi dengan penghambatan pertumbuhan bakteri pada formulasi kombinasi 3:2:1 dan 2:3:1 semakin baik. Turunan fenol juga berinteraksi dengan dinding sel bakteri dan mengakibatkan terjadinya absorpsi dan penetrasi ke dalam sel bakteri. Penetrasi ini menyebabkan presipitasi dan denaturasi protein membran

plasma. Denaturasi ini pada akhirnya menyebabkan lisis dan mengakibatkan membran sel bakteri rusak dan mati. mekanisme kerja curcumin sebagai antibakteri adalah dengan cara menghambat proliferasi sel bakteri. Kunyit memiliki efek farmakologi diantaranya, menurunkan kadar lemak tinggi, asma, hepatitis, anti empedu, anti radang, anti diare, dan bersifat sebagai anti inflamasi atau anti peradangan. Curcumin dan juga minyak atsiri mampu menghambat pertumbuhan bakteri penyebab infeksi jaringan mukosa, antara lain yang disebabkan oleh *Staphylococcus* sp, *Bacillus* sp, dan *Escherichia coli*.

Pada formulasi kombinasi 1:2:3 dan 2:1:3 mengandung ekstrak Kunyit dengan komposisi 50%, menunjukkan kecenderungan bersifat sebagai antifungi. Minyak atsiri dalam rimpang Kunyit di samping dapat bersifat antibakteri, juga sangat potensial sebagai antifungi, antioksidan, dan antihepatotoksik, yang dipengaruhi oleh curcumin dan minyak atsiri.. Kandungannya berkisar 3% - 5%, yang terdiri dari golongan senyawa monoterpen dan sesquiterpen. Minyak esensial yang terkandung dalam rimpang kunyit lainnya seperti ar-tumeron (31,1%), tumeron (10%), kurlon (10,6%), dan ar-curcumin (6,3%). Peran senyawa

metabolit curcumin sebagai antifungi bersifat menekan pertumbuhan hifa dan miselium jamur, sehingga menghambat pertumbuhan jamur lebih lanjut.

Mekanisme kerja antifungi dalam rimpang Kunyit bekerja menghambat enzim sitokrom P450 yang dibutuhkan untuk mempertahankan integritas membran sel jamur. Metabolit antijamur dalam rimpang Kunyit mampu menurunkan tegangan permukaan membran sterol dari dinding *Candida albicans*, akibatnya permeabilitasnya meningkat. Peningkatan permeabilitas mengakibatkan cairan intraseluler menjadi lebih pekat dan akhirnya tertarik keluar sel. Keluarnya cairan intraseluler sel jamur mengalami pembengkakan, dan dalam waktu inkubasi tertentu menyebabkan kematian sel jamur.

Beberapa referensi juga menyebutkan senyawa antifungi dalam rimpang Kunyit dapat mengganggu metabolisme energi dalam mitokondria, yaitu pada proses transfer elektron dan fosforilasi. Antifungi tersebut mengganggu proses kimiawi transfer electron, yang diawali dengan penghambatan metabolisme energi di dalam mitokondria. Terhambatnya transfer elektron akan mengurangi oksigen dan mengganggu fungsi dari siklus asam trikarboksilat. Jika transfer electron terhambat,

maka proses kimiawi lebih lanjut tidak akan terjadi. Dengan terhambatnya transfer electron, maka tahap fosforilasi tidak akan terjadi. Akibatnya pembentukan ATP dan ADP juga terhambat. Minyak atsiri dapat menghambat pertumbuhan kelompok jamur atau khamir, salah satunya adalah *Candida albicans*. Mekanisme kerja antijamur minyak atsiri yaitu gugus fenol dalam minyak atsiri membentuk kompleks dengan protein dalam membran sel, sehingga terjadi penggumpalan. Protein yang menggumpal mengalami denaturasi, akibatnya permeabilitas membran sel menurun, transport nutrisi dalam sel terganggu, pada akhirnya pertumbuhan jamur terhambat. Penghambatan pertumbuhan inilah yang tampak sebagai zona hambat pertumbuhan sel secara in vitro.



REFERENSI

1. Agustina, S., Aidha, N. N., Oktarina, E., & Haruminda, J. H. 2019. Optimasi Proses Ekstraksi Karoten Dan Klorofil Dari *Spirulina Platensis* Dengan Teknologi Karbon Dioksida (CO₂) Superkritis Menggunakan Metode Permukaan Tanggap. *Jurnal Kimia dan Kemasan*, 41(2), 95-104.
2. Ambarwati, D. R. 2018. Uji Aktivitas Infusa Daun Kersen dan Serbuk Instan Perasan Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) Terhadap Peningkatan Daya Ingat Mencit Putih (*Mus musculus*) dengan Metode *Morris Water Maze* (Doctoral dissertation, Universitas Setia Budi Surakarta).
3. Aprilah, I. 2016. Ekstraksi Antioksidan Lycopene dari Buah Tomat (*Hylocereus Undatus*) Menggunakan Pelarut Etanol-Heksan (Doctoral dissertation, Politeknik Negeri Sriwijaya).

4. Ardianingsih, R. 2010. Penggunaan High Performance Liquid chromatography (HPLC) dalam proses analisa deteksi ion. *Berita Dirgantara*, 10(4).
5. Dahlia, S. 2019. Pengaruh Pemberian Dekok Beras Putih, Beras Merah dan Beras Hitam Terhadap Efek Hiperglikemia pada Mencit Putih Jantan Galur *Swiss Webster* (Doctoral dissertation).
6. Dewi, A. T. C., Romadhoni, F., Qadariyah, L., & Mahfud, M. 2018. Potensi Klorofil Ekstrak Mikroalga Hijau (*Chlorella* sp.) dan Daun Suji (*Pleomele angustifolia*) Menggunakan Metode Soxhlet sebagai Dye Sensitizer pada Dye Sensitized Solar Cells (DSSC). *Jurnal Teknik ITS*, 7(1), F124-F126.
7. Dewi, S. M. (2000). Penetapan Kadar Metanol Hasil Destilasi Penguap Vakum Putar Ekstrak Metanol Daun Ubi Ungu Menggunakan Raman Spektrofotometer. *Jurnal Farmasi Udayana*, 7(1), 13-18.
8. Febriana, F., & Oktavia, A. I. 2019. Perbedaan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak Daun Kejibeling (*Strobilanthus crispus* L. Blume) Hasil Metode Maserasi dan Perkolasi (Doctoral dissertation, Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang).

9. Fuadi, A. 2012. Ultrasonik Sebagai Alat Bantu Ekstraksi Oleoresin Jahe. *Jurnal Teknologi*, 12(1), 14-21.
10. Hanan, Endang. 2015. Analisis Fitokimia. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
11. Idroes, Rinaldi, dkk. 2018. *Kromatografi Gas Waktu Mati dan Indeks Retensi Kovats*. Aceh: Syiah Kuala University Press.
12. Irawan, t. a. (2010). Peningkatan Mutu Minyak Nilam dengan Ekstraksi dan Destilasi Pada Berbagai Komposisi Pelarut (Doctoral Dissertation, Diponegoro University).
13. Irfan, Y. P. 2018. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) dan Penetapan Kadar Flavonoid Totalnya (Doctoral dissertation, Universitas Wahid Hasyim Semarang).
14. Karim, S. F. 2014. Uji Aktivitas Infusa Daun Srikaya (*Annona Squamosa* L.) Terhadap Penurunan Kadar Asam Urat dalam Darah Mencit (*Mus Musculus*) (Doctoral dissertation, UIN Alauddin Makassar).
15. Kautsari, S. N., Purwakusumah, E. D., & Nurcholis, W. (2020). Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa* Linn) Segar dan Simplisia

- dengan Variasi Metode Ekstraksi. *Media Farmasi*, 16(1), 65-70.
16. Leba, M. A. U. 2017. Buku Ajar Ekstraksi dan Real Kromatografi. Yogyakarta: CV Budi Utama.
 17. Lisiyana, N. 2016. *Isolasi senyawa alkaloid fraksi etil asetat tanaman Anting-Anting (Acalypha Indica L) dengan variasi kecepatan laju alir menggunakan kromatografi kolom* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
 18. Maduqi, A. F., Izzati, M., & Prihastanti, E. (2014). Efek metode pengeringan terhadap kandungan bahan kimia dalam rumput laut sargassum polycystum. *ANATOMI FISIOLOGI*, 22(1), 1-9.
 19. Maulida, D., & Zulkarnaen, N. 2010. *Likopen, Ekstraksi, Solven Campuran n-heksana, Etanol, dan Aseton* (Doctoral dissertation, Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik).
 20. Nirwana, p. C. 2019. Studi o-metilasi pada Sintesis Senyawa 1-metoksi Naftalen Dengan Variasi Jumlah Mol Dimetil Karbonat (dmc) dan Variasi Waktu Refluks Berbasis Green Chemistry.
 21. Putra, E. D. L. 2004. Kromatografi cair kinerja tinggi dalam bidang farmasi. *USU Digital Library, Sumatera Utara*.

22. Rahayu, s. 2017. *Isolasi Pektin dari Kulit Pepaya (Carica Papaya L.) Dengan Metode Refluks Menggunakan Pelarut HCL Encer* (Doctoral dissertation, Politeknik Negeri Sriwijaya).
23. Rochani, N. 2009. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) terhadap *Candida albicans* Serta Skrining Fitokimianya (Doctoral dissertation, Univerversitas Muhammadiyah Surakarta).
24. Rosselita, p. d. 2020. Pembuatan Liqueur Beraroma Buah *Carica* dengan Metode Perkolasi.
25. Rubiyanto, Dwiwarso. 2016. *Teknik Dasar Kromatografi*. Yogyakarta: Deepublish.
26. Rubiyanto, Dwiwarso. 2017. *Metode Kromatografi Prinsip Dasar, Praktikum & Pendekatan Pembelajaran Kromatografi*. Yogyakarta: Deepublish.
27. Rubiyanto, Dwiwarso. 2017. *Metode Kromatografi Prinsip Dasar, Praktikum Dan Pendekatan Pembelajaran Kromatografi*. Yogyakarta: CV Budi Utama.
28. Safitri, I., Nuria, M. C., & Puspitasari, A. D. 2018. Perbandingan Kadar Flavonoid Dan Fenolik Total Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Pluchea Indica L.*)

Pada Berbagai Metode Ekstraksi. *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*, 3(1).

29. Sari, D. K., Wardhani, D. H., & Prasetyaningrum, A. (2012). Pengujian Kandungan Total Fenol *Kappahycus alvarezzi* dengan Metode Ekstraksi Ultrasonik dengan Variasi Suhu dan Waktu. *Prosiding SNST Fakultas Teknik*, 1(1).
30. Sulistianingrum, A. P., Haswati, H., Apriana, S., Hartati, I., & Suwardiyono, S. (2020). Ekstraksi Berbantu Gelombang Mikrominyak Esensial: Narrative Review. *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*, 5(2).
31. Susanti, S. 2010. Penetapan Kadar Formaldehid pada Tahun yang dijual di Pasar Ciputat dengan Metode *Spektrofotometri* uv-vis disertai Klorimetri Menggunakan Pereaksi Nasih.
32. Tania, L. 2018. Pengembangan Animasi Berbasis Simulasi Molekul pada Metode Destilasi. *Jurnal Pendidikan dan Pembelajaran Kimia*, 7(2).
33. TIME, I. 2014. Pengaruh Lama Ekstraksi dan Konsentrasi Pelarut Etanol Terhadap Sifat Fisika-Kimia Ekstrak Daun Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni* M.) Dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (Mae). *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*, 2(1), 35-41.

34. Vallepi, R. R. 2017. Peningkatan Kadar Zingiberen Dalam Minyak Atsiri Jahe Menggunakan Metode Ekstraksi Cair Cair Dengan Asam Sitrat (*Increasing of Zingiberene Content in Essential Ginger Using liquid-liquid Ekstraction with citric acid*) (Doctoral dissertation, undip).
35. Wahab, A. W., La Nafie, N. U. R. S. I. A. H., & Alam, F. M. D. I. P. Mata Kuliah Metode Pemisahan Dan Pengukuran 2 (Elektrometri Dan Spektrofotometri).
36. Walman, E.(2006) pengolahan limbah cair dengan cara evaporasi.
37. Yanti, A. 2018. *Optimalisasi Metode Penentuan Kadar Etanol dan Metanol Pada Minuman Keras Oplosan Menggunakan Kromatografi Gas (KG)* (Doctoral dissertation, Universitas Negeri Semarang).
38. Yennie, E., & Elystia, S. 2013. Pembuatan Pestisida Organik Menggunakan Metode Ekstraksi dari Sampah Daun Pepaya dan Umbi Bawang Putih. *Jurnal Dampak*, 10(1), 46-59.
39. Yurleni, Y. 2018. Penggunaan Beberapa Metode Ekstraksi Pada Rimpang Curcuma Untuk Memperoleh Komponen Aktif Secara Kualitatif. *Biospecies*, 48-56.