



**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN TEBU DALAM
BERBAGAI METODE PREPARASI DAN KONSENTRASI
TERHADAP BAKTERI GRAM-POSITIF DAN GRAM-
NEGATIF**

SKRIPSI

disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

Program Studi Biologi

Oleh:

KHOIRUL MUKHTAR

NIM. 4411415044

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
SEMARANG**

2020

PERNYATAAN

Dengan ini, saya:

Nama : Khoirul Mukhtar

NIM : 4411415044

Program studi : Biologi

menyatakan bahwa skripsi berjudul “Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tebu dalam berbagai Metode Preparasi dan Konsentrasi terhadap Bakteri Gram-Positif dan Gram-Negatif” ini benar-benar karya saya sendiri bukan jiplakan dari karya orang lain atau pengutipan dengan cara-cara yang tidak sesuai etika keilmuan yang berlaku baik sebagian atau seluruhnya. Pendapat atau temuan orang atau pihak lain yang terdapat dalam skripsi ini telah dikutip atau dirujuk berdasarkan kode etik ilmiah. Atas pernyataan ini, saya pribadi siap menanggung resiko/sanksi hukum yang dijatuhkan apabila ditemukan pelanggaran terhadap etika keilmuan karya ini.

Semarang, Juli 2020



Khoirul Mukhtar

NIM. 4411415044

PENGESAHAN

Skripsi berjudul

“Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tebu dalam berbagai Metode Preparasi dan Konsentrasi terhadap Bakteri Gram-Positif dan Gram-Negatif” disusun oleh:

Nama : Khoirul Mukhtar

NIM : 4411415051

telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang pada 20 Februari 2020.

Ketua



Dr. Sugianto, M.Si.
FMIPA
NIP. 196102191993031001

Sekretaris



Dr. dr. Nugrahaningsih W.H, M. Kes.

NIP. 196907091998032001

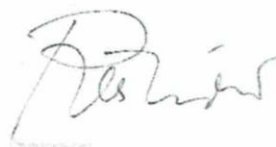
Penguji I,



Drs. Krispinus Kedati Pukan M.Si.

NIP. 195507311985031002

Penguji II,



Dr. Pramesti Dewi, M.Si.

NIP. 196509081989032001

Anggota Penguji/Pembimbing



Talitha Widiatningrum, S.Si., M.Si., Ph.D.

NIP. 198009292005012004

MOTTO DAN PERSEMBAHAN

MOTTO

Tidak ada kesuksesan melainkan
dengan pertolongan Allah SWT.

(Q.S. Huud: 88)

PERSEMBAHAN

Bagi masyarakat, petani tebu dan industri
yang memanfaatkan tanaman herbal sebagai
antibakteri dan Jurusan Biologi FMIPA
UNNES.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan nikmat dan karunia-Nya yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul ***“Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tebu dalam berbagai Metode Preparasi dan Konsentrasi terhadap Bakteri Gram-Positif dan Gram-Negatif.”***

Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan dalam mencapai Sarjana Sains di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

Adapun dalam penyusunan skripsi ini, penulis mendapat bimbingan, saran, dan dukungan dari berbagai pihak, sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk dapat melaksanakan studi Strata 1 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang yang memberikan kemudahan administrasi dalam proses penyusunan skripsi.
3. Ketua Jurusan Biologi Universitas Negeri Semarang yang memberikan kemudahan administrasi dalam proses penyusunan skripsi.
4. Bapak Dr. Krispinus Kedati Pukan, M.Si selaku penguji I yang telah memberikan bimbingan dalam proses penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Dr. Pramesti Dewi, M.Si selaku penguji II yang telah memberikan bimbingan dalam proses penyusunan skripsi ini.
6. Ibu Talitha Widiatningrum S.Si, M.Si, Ph.D, selaku dosen pembimbing dan payung yang telah memberikan bimbingan, dukungan serta masukan dalam penyusunan skripsi ini.
7. Orang tua saya yang selalu memberikan dukungan baik moril maupun materil, semoga kelak saya bisa menjadi anak yang membanggakan.
8. Ibu Dr. Niken Subekti, M.Si selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan, arahan serta dukungan dalam penyusunan skripsi ini.

9. Adikku Dewi Zulaihah yang juga telah memberikan dukungan dan selalu mengingatkan akan sabar dalam menghadapi ujian dari Allah SWT.
10. Sahabat dan teman-teman tercinta (Hanifah Dian, Dhanang, Umar, Taufik, Erik, Aziz) yang sama-sama berjuang, menemani dan saling menguatkan dalam perjuangan.
11. Teman-teman satu dosen pembimbing dan payung penelitian (Uswatun Khasanah dan Nita Setia Wijia Pujiastuti) yang mau berjuang bersama dan saling menguatkan dalam perjuangan skripsi ini.
12. Rombel 2 Biologi 2015 yang sudah mengukir cerita dan kenangan selama 4 tahun ini.
13. Laboran dan Staf Laboratorium Biologi Unnes yang telah membantu dalam prosen penelitian ini.
14. Semua pihak yang tidak bisa penulis tuliskan satu per satu yang telah memberikan dukungan dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan. Kritik dan sarang yang membangun dari para pembaca sekalian sangat penulis harapkan. Semoga laporan skripsi penelitian ini dapat bermanfaat khususnya bagi bidang biologi.

Semarang, Juli 2020

Penulis

Khoirul Mukhtar

ABSTRAK

Muhtar, Khoirul. 2020. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tebu dalam berbagai Metode Preparasi dan Konsentrasi terhadap Bakteri Gram-Positif dan Gram-Negatif. Skripsi, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang. Talitha Widiatningrum, S.Si., M.Si., Ph.D.

Peningkatan area pertanaman tebu menyebabkan bertambahnya limbah. Limbah yang dihasilkan dari pengolahan tebu salah satunya berupa pucuk daun tebu yang mencapai 4,62 juta ton Ha/tahun. Jika limbah daun tebu dapat ditemukan nilai lebihnya, tentu akan memberikan manfaat. Salah satu alternatif yang ditawarkan untuk pemanfaatan limbah tebu adalah sebagai sumber antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun tebu yang paling efisien untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram-positif dan gram-negatif. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial 2 faktor yaitu: (1) perlakuan pengeringan meliputi daun tebu kering oven, daun tebu tanpa pengeringan dan daun tebu kering angin dan (2) konsentrasi ekstrak daun tebu yaitu 25%, 50%, 75% dan 100% kontrol positif berupa antibiotik amoxilin dan kontrol negatif berupa aquades. Pengujian antibiotik dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram kertas. Daya hambat bakteri diuji menggunakan ANOVA dua arah. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat hubungan atau interaksi yang signifikan antara tingkat konsentrasi ekstrak daun tebu dan metode pengeringan dengan besar diameter zona hambat bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. Pada hasil uji *tukey* antara kontrol negatif dengan tingkat konsentrasi 25% tidak menunjukkan perbedaan yang berarti sedangkan antara kontrol negatif dengan tingkat konsentrasi 50%, 75% dan 100% menunjukkan perbedaan yang berarti, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun tebu pada tingkat konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% memiliki potensi dalam menghambat bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* sedangkan pada tingkat kontrol negatif tidak memiliki potensi menghambat bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*.

Kata kunci: antimikroba, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharum officinarum* L

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN	ii
PENGESAHAN	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Penegasan Istilah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tanaman Tebu (<i>Saccharum officinarum</i> L)	7
2.1.1 Taksonomi Tanaman Tebu.....	7
2.1.2 Morfologi Tanaman Tebu.....	8
2.1.3 Kandungan Tanaman Tebu	8
2.1.4 Metabolit Sekunder	9
2.2 Bakteri	12
2.2.1 Bakteri Gram-positif dan Taksonomi	12
2.2.2 Bakteri Gram-negatif dan Taksonomi	14
2.3 Uji Antibakteri.....	16
2.3.1 Definisi.....	16
2.3.2 Uji Antibakteri dengan Metode Difusi	16

2.4 Kerangka Berfikir	19
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Lokasi Penelitian	20
3.2 Waktu Penelitian.....	20
3.3 Sampel Penelitian	20
3.4 Variabel Penelitian	20
3.5 Rancangan Penelitian	20
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	21
3.7 Prosedur Penelitian.....	22
3.8 Metode Pengumpulan Data	24
3.9 Metode Analisis Data.....	24
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian	25
4.1.1 Hasil Uji Antibakteri	25
4.1.2 Hasil Uji Two Way Anova.....	26
4.2 Pembahasan	28
4.2.1 Preparasi Daun Tebu	28
4.2.2 Ekstraksi Daun Tebu	29
4.2.3 Uji Antibakteri	30
BAB 5 PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	35
5.2 Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA.....	36
LAMPIRAN.....	41

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Hasil Uji beda Tukey Diameter Zona Hambat <i>Bacillus subtilis</i> yang Terbentuk dengan Konsentrasi negatif dan Kontrol Positif.....	27
4.2 Hasil Uji beda Tukey Diameter Zona Hambat <i>Escherichia coli</i> yang Terbentuk dengan Konsentrasi negatif dan Kontrol Positif.....	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Tanaman Tebu.....	8
2.2	Struktur kimia flavonoid.....	10
2.3	Kompleks senyawa flavonoid – dinding sel bakteri.....	11
2.4	Bakteri <i>B. subtilis</i> dan Biakan.....	12
2.5	Bakteri <i>E. coli</i> dan Biakan.....	15
2.6	Kerangka Berfikir.....	19
4.1	Zona hambat ekstrak daun tebu preparasi daun basah bakteri <i>E. Coli</i> dan <i>B. subtilis</i>	25
4.2	Zona hambat ekstrak daun tebu preparasi daun kering oven bakteri <i>E. Coli</i> dan <i>B. subtilis</i>	26
4.3	Zona hambat ekstrak daun tebu preparasi daun dikering anginkan bakteri <i>E. Coli</i> dan <i>B. subtilis</i>	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Surat Izin Penelitian.....	41
2. Tabel Penyajian Data Diameter Zona Hambat (mm)	42
3. Hasil uji Anova dua arah dengan uji lanjut Tukey pada taraf signifikansi 5% <i>B. subtilis</i>	42
4. Hasil uji Anova dua arah dengan uji lanjut Tukey pada taraf signifikansi 5% <i>E. coli</i>	48
5. Dokumentasi penelitian.....	53

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) banyak dibudidayakan di Indonesia baik oleh pemerintah maupun perkebunan rakyat. Tebu menjadi sumber bahan baku industri gula pasir. Luas area perkebunan tebu di Indonesia mencapai 344 ribu hektar pada tahun 2004 dan terus bertambah hingga mencapai 416,7 ribu hektar pada tahun 2018 (Badan Pusat Statistik, 2019).

Seiring dengan meningkatnya industri gula nasional, usaha budidaya tebu terus berkembang dan menjadi sumber pendapatan bagi banyak petani tebu di Indonesia. Menurut Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian (2019) sentra penanaman tebu di Indonesia tahun 2015-2019 terdapat di Provinsi Jawa Tengah dengan luas 45,06%. Peningkatan area pertanaman tebu muncul sebagai akibat dari bertambahnya kebutuhan gula. Industri gula seperti produksi lainnya memiliki limbah yang cukup banyak (Hasanuddin & Purba, 2016).

Limbah yang dihasilkan dari pengolahan tebu salah satunya berupa pucuk daun tebu yang mencapai 4,62 juta ton/Ha/tahun (Hasanudin & Purba, 2016). Jika limbah daun tebu dapat ditemukan nilai lebihnya, tentu akan memberikan manfaat dan memberikan informasi bagi masyarakat. Salah satu alternatif yang ditawarkan untuk pemanfaatan limbah tebu adalah sebagai antibakteri. Antibakteri menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran sel dan dinding sel. Antibiotik dapat dihasilkan secara kimiawi maupun non kimiawi yaitu dengan bantuan mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif termasuk antibakteri (Ambarwati *et al.*, 2013).

Penyakit infeksi adalah suatu penyakit yang disebabkan karena adanya mikroba patogen (Darmadi, 2008). Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri (Radji, 2011). Penelitian uji aktivitas antibakteri ini dilakukan dengan cara menguji ekstrak hasil maserasi terhadap bakteri *B. subtilis* dan *E. coli*. Penggunaan bakteri tersebut dikarenakan kedua bakteri tersebut mewakili bakteri gram-positif dan gram-negatif, dan merupakan indikator dari bakteri umum yang memiliki sifat berbeda, serta merupakan perwakilan dari bakteri yang bersifat patogen pada hewan dan manusia (Elfidasari *et al.*, 2011).

Bakteri *B. subtilis* adalah bakteri gram-positif yang memiliki habitat alami pada manusia yaitu usus halus dan usus besar. Jumlahnya yang banyak di dalam usus mampu menyebabkan diare yang ditularkan melalui kontaminasi makanan (Rahmaningsih., *et al*, 2012).

Bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri gram-negatif yang secara normal hidup di dalam usus manusia dan dapat menyebabkan penyakit serta bersifat patogen (Pratiwi, 2008). Penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Escherichia coli* seperti infeksi sistem saluran kencing dan diare. Tanda dan gejala infeksi saluran kencing meliputi frekuensi kencing, disuria, hematuria dan piuria (Jawetz *et al.*, 2005).

Timbulnya berbagai penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri mendorong untuk terus dilakukannya penelitian baru yang mampu menghasilkan antibiotik baru serta memiliki efikasi yang optimal untuk mengobati penyakit infeksi. Pengendalian terhadap bakteri *B. subtilis* dan *E. coli* dapat menggunakan tanaman yang memiliki kandungan kimia alami antimikroba sehingga diharapkan dapat menekan pertumbuhan bakteri *B. subtilis* dan *E. coli* (Karlina., *et al*, 2013). Namun, penggunaan zat antibakteri tidak disarankan digunakan secara berlebihan karena dapat mengakibatkan resistensi bakteri terhadap zat tersebut.

Daun tebu diketahui memiliki potensi farmakologi. Ekstrak daun tebu mengandung unsur-unsur polifenol seperti asam ferulat, asam caffeic, pigenin dan vitexin yang menunjukkan aktivitas biologis terhadap anti-mutasi dan anti-inflamasi (Abbas *et al.*, 2014). Batang tanaman tebu *Saccharum officinarum* L setelah diekstraksi dengan metanol 70% dapat memberikan aktivitas antioksidan dan anti proliferasi (Almeida, 2011).

Sementara itu, kandungan fitofarmaka daun tebu adalah fenol, alkaloid dan flavonoid (Zhao *et al.*, 2015). Senyawa hasil ekstraksi tersebut termasuk golongan polifenol yang mempunyai ikatan N-H, -CH₂, -CH₃, dan ikatan rangkap terkonjugasi, yang menunjukkan kemungkinan ekstrak daun tebu memiliki aktivitas antimikroba. Hasil uji dengan analisis kromatografi cair ekstrak daun tebu mengandung senyawa polifenol seperti asam ferulat, asam kafeat, pigenin dan vitexin. Adanya senyawa tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun tebu dapat berkontribusi dalam aktivitas biologis sebagai anti-mutasi dan anti-inflamasi

(Abbas *et al.*, 2014). Kajian tentang fitofarmaka terkait daun tebu telah banyak dijumpai, tetapi belum ada eksperimen uji daya hambat ekstrak daun tebu terhadap bakteri gram-positif maupun gram-negatif. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang aktivitas antibakteri melalui ekstrak daun tebu terhadap bakteri gram-positif dan gram-negatif.

Senyawa bioaktif dapat diekstrak dari suatu tanaman setelah melalui beberapa proses. Proses yang paling penting pada ekstraksi senyawa bioaktif adalah preparasi. Preparasi adalah proses untuk mempertahankan kandungan biomolekul dalam tanaman sebelum dilakukan ekstraksi (Azwanida, 2015). Metode preparasi untuk sampel daun, akar, kulit, buah dan bunga dapat dilakukan melalui preparasi tanpa pengeringan atau kering (Azwanida, 2015). Proses pengeringan saat preparasi sampel bertujuan untuk menekan volume dan berat bahan serta memperpanjang daya simpannya sehingga memudahkan penanganan dan proses selanjutnya (Risfaheri *et al.*, 1995). Pada penelitian ini, dilakukan variasi metode preparasi ekstrak daun tebu terhadap aktivitas antibakteri untuk gram-positif dan gram-negatif. Selain variasi metode, dilakukan juga variasi konsentrasi ekstrak daun tebu dalam menghambat pertumbuhan gram-positif dan gram-negatif.

1.2. Rumusan masalah

1. Apakah ekstrak daun tebu dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram-positif dan gram-negatif?
2. Manakah proses preparasi yang paling baik untuk mendapatkan ekstrak daun tebu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram-positif dan gram-negatif?
3. Berapa konsentrasi ekstrak daun tebu yang paling efisien untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram-positif dan gram-negatif?

1.3. Penegasan Istilah

Untuk menghindari salah pengertian dalam memahami isi skripsi ini, perlu ada batasan-batasan terhadap beberapa istilah sebagai berikut:

1. Daun tebu

Daun tebu yang digunakan pada penelitian ini diambil dari tanaman tebu varietas VMC 86-550 yang berada di kebun dekat PG Rendeng Kudus seluas 1.799 Ha. Daun yang diambil adalah daun dari tanaman yang berumur 11 bulan. Daun dipotong secara “dikletek” atau dikenal sebagai kletekan dimulai dari daun yang terletak pada posisi 20 cm dari pucuk batang hingga pangkal batang. Daun yang digunakan ini adalah daun yang tidak lagi dimanfaatkan oleh petani tebu.

2. Ekstrak daun tebu

Ekstrak daun tebu yang digunakan adalah ekstrak kering daun tebu. Ekstrak ini diperoleh dengan cara memaserasi daun tebu dalam pelarut polar yaitu etanol selama 3 hari dan kemudian dikeringkan dengan *rotary evaporator*. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Laboratorium Biokimia Jurusan Biologi Universitas Negeri Semarang.

3. Metode Preparasi

Pada proses preparasi terdapat tiga metode preparasi yaitu preparasi basah, kering angin, dan kering oven. Satu bagian daun dikeringanginkan dengan cara diletakkan diatas kertas koran dan diratakan dalam suhu ruangan hingga kering. Satu bagian daun dikering ovenkan dengan cara diletakkan ke dalam oven dengan suhu 50°C hingga kering. Kondisi kering yang dimaksud dari keadaan di atas adalah hingga bisa dipatahkan dengan mudah. Satu bagian daun direndam ke aquades lalu dikeringkan terlebih dahulu. Preparasi ini kemudian disebut sebagai preparasi basah.

4. Bakteri gram-positif

Bakteri gram-positif yang digunakan pada penelitian ini adalah Bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNDIP. Bakteri yang digunakan berumur satu hari pada media *Blood Agar Plate* (BAP).

5. Bakteri gram-negatif

Bakteri gram-negatif yang digunakan pada penelitian ini adalah *Escherichia coli* 25922. Biakan murni bakteri *E. coli* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, UNDIP. Bakteri yang digunakan berumur satu hari pada media *Mueler Hinton Agar* (MHA).

1.4. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui kemampuan ekstrak senyawa polar dari daun tebu dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram-positif dan gram-negatif.
2. Menentukan dan menganalisis proses preparasi yang paling baik untuk mendapatkan ekstrak daun tebu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram-positif dan gram-negatif.
3. Menentukan dan menganalisis konsentrasi ekstrak daun tebu yang paling efisien untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram-positif dan gram-negatif.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Bagi Peneliti

Peneliti mendapatkan pengalaman penelitian dan mengetahui proses preparasi dalam membuat ekstrak daun tebu yang efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Selain itu, skripsi ini sebagai tugas akhir untuk memperoleh gelar sarjana Sains Program Studi Biologi.

2. Bagi Institusi Pendidikan

Penelitian ini adalah penelitian awal yang mengembangkan penelitian unggul dan berkelanjutan, pengembangan serta penerapan sains dan teknologi, untuk kesejahteraan masyarakat serta kemajuan bangsa dan negara. Inovasi penggunaan senyawa polar daun tebu dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

3. Bagi Masyarakat

Informasi bagi masyarakat mengenai ekstrak daun tebu dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L)

2.1.1 Taksonomi Tanaman Tebu

Tebu (*Saccharum officinarum* L) adalah tanaman yang ditanam untuk bahan baku gula. Tanaman tebu termasuk salah satu anggota dari Familia *Graminae*. Tebu merupakan tumbuhan monokotil yang umumnya dibudidayakan di daerah tropis dan subtropics karena memiliki kandungan sukrosa tinggi dan kandungan serat rendah (Wijayanti, 2008). Tanaman tebu tumbuh dengan baik pada daerah tropis yang memiliki kelembapan >70% dan suhu udara berkisar antara 28-34^oC (Farid, 2003). Indonesia memiliki iklim tropis, sehingga tebu dapat tumbuh subur di wilayah Indonesia. Tebu merupakan tanaman perkebunan semusim yang dipanen satu kali. Tebu sebagai bahan baku industri gula merupakan salah satu komoditi perkebunan yang mempunyai peran strategis dalam perekonomian di Indonesia (Astutik, 2017).

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L) mempunyai klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Liliopsida</i>
Sub Kelas	: <i>Commelinidae</i>
Ordo	: <i>Poales</i>
Famili	: <i>Graminae</i> atau <i>Poaceae</i>
Genus	: <i>Saccharum</i>
Spesies	: <i>Saccharum officinarum</i> L

(Tarigan & Sinulingga, 2006)



Gambar 2.1 Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) varietas VMC 86-550
(Sumber: Litbang Induk, 2012)

2.1.2 Morfologi Tanaman Tebu

Tanaman tebu memiliki akar serabut dengan batang lurus, dan tidak bercabang. Tinggi batang tanaman 3-5 m. Batang tanaman tebu beruas-ruas (panjang ruas 10-30 cm/ruas). Diameter batang berkisar antara 2,5 cm - 5,0 cm. Warna dan kekerasan batang bervariasi sesuai varietas (James, 2004). Berdasarkan warna batang tanaman tebu terdapat warna kuning, hitam, merah, anggur merah, hijau, hijau gelap dan batang dengan warna kuning kemerahan (Ekpélikpézé *et al.*, 2016).

Daun tebu merupakan daun tidak lengkap, karena hanya terdiri dari pelepah dan helaian daun. Daun tebu melekat pada internodus batang. Pelepah daun tebal dan memiliki panjang sekitar 30-60 cm dan lebar 5 cm (Miraj, 2016). Bunga tebu berupa malai dengan panjang sekitar 50-80 cm, Cabang bunga berupa tandan dengan bulir panjang 3-4 mm (Indrawanto *et al.*, 2010).

2.1.3 Kandungan Tebu

Daun Tebu memiliki potensi sebagai obat. Daun tebu mengandung senyawa berupa asam fenolik, flavonoid dan glikosida, dengan nilai aktivitas antioksidan sebesar 62.3 µg/ml (Abass *et al.*, 2014). Ekstrak daun tebu mengandung sejumlah besar asam fenolik dan flavonoid aglycone tricetin (5,7,4-trihydroxy-3,5-dimethoxyflavone) yang memiliki aktivitas sitotoksik serta dapat berpotensi sebagai pembunuh sel kanker dalam tubuh (Alves *et al.*, 2016). Daun tebu memiliki kandungan senyawa metabolik sekunder yang mampu untuk

menghambat pertumbuhan bakteri. Metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman tebu tersebut adalah alkaloid, flavonoid, steroid, tannin, saponin, triterpenoid, kumarin (Omojate, 2014).

2.1.4 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder adalah senyawa hasil biosintesis turunan dari metabolit primer yang umumnya diproduksi oleh organisme yang berguna untuk pertahanan diri dari lingkungan maupun dari serangan organisme lain. Metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman adalah alkaloid, flavonoid, steroid, tannin, saponin, triterpenoid, kumarin (Omojate *et al.*, 2014). Senyawa-senyawa tersebut dapat berguna sebagai antibakteri.

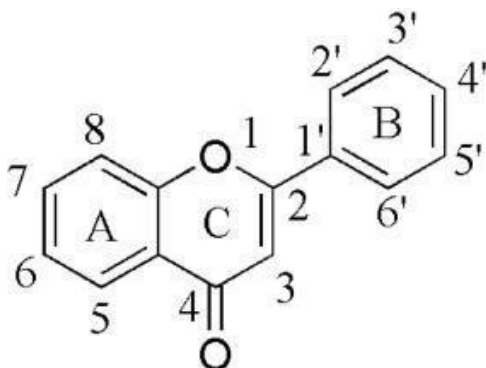
Kandungan daun tebu yang penting terkait dengan aktivitas antibakteri adalah sebagai berikut:

1. Flavonoid

Senyawa flavonoid adalah salah satu kelompok senyawa fenol yang paling melimpah di alam. Flavonoid termasuk substansi pigmen larut air yang ditemukan hampir disetiap tumbuhan tingkat tinggi dan bertanggung jawab terhadap warna merah, merah muda, ungu dan biru pada bunga dan buah. Selain itu flavonoid juga dapat ditemukan pada seluruh bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit dan biji (Gutzeit & Ludwig, 2014).

Biosintesis senyawa flavonoid dapat melalui dua jalur yaitu jalur asam sikimat dan jalur asam malonat. Senyawa pembentuk flavonoid terdiri dari rangka C₆-C₃-C₆, dua cincin aromatik diikat melalui penghubung tiga rantai karbon (Santos & Arturo, 2017). Flavonoid banyak ditemukan pada sayuran dan buah-buahan yang bervariasi dalam jenis kandungan dan aktivitas antioksidannya (Redha, 2010). Flavonoid memiliki kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dua cincin benzene (C₆) terikat pada sebuah cincin heterolik(C₃).

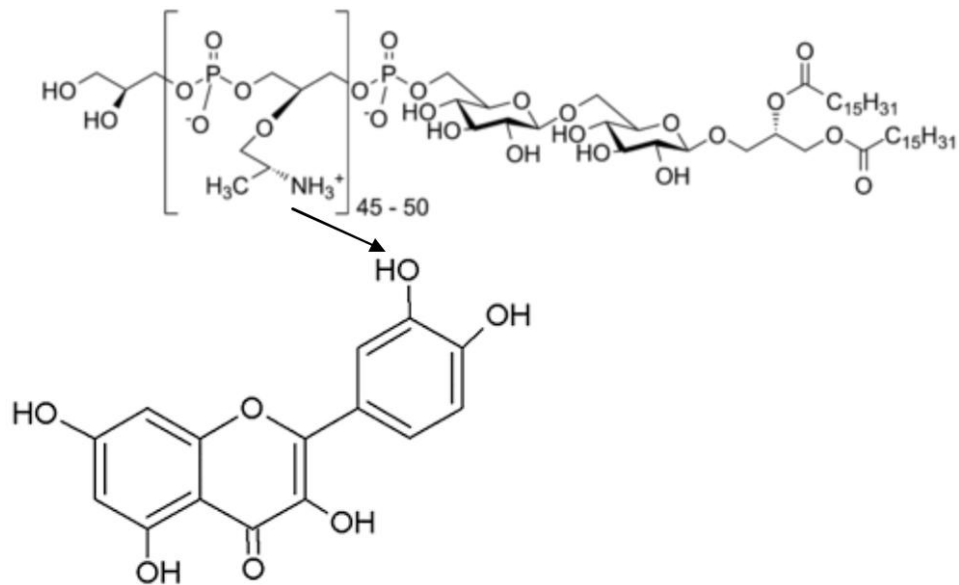
Struktur dasar flavonoid meliputi:



Gambar 2.2 Struktur kimia flavonoid (Wang *et al.*, 2017)

Flavonoid dapat dibedakan menjadi beberapa kelas diantaranya flavones (flavon, apigenin, dan luteolin), flavonols (quercetin, kaempferol, myricetin, dan fisetin), flavanon (flavonon, hesperetin, dan naringenin), isoflavon, khalkon, proantosianidin, antosianin dan dihidrokhalkon. Flavonoid dapat berupa aglikon, glikon dan turunan metilat. Pada dasarnya struktur flavonoid adalah aglikon (Khumar & Abhay, 2013).

Flavonoid memiliki aktivitas antibakteri melawan *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Styphimurium* dan *bacillus cereus* (Jalal *et al.*, 2015). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah dengan menghambat sintesis asam nukleat, mengganggu fungsi membran sel dan metabolisme energi (Cushnie & Lamb, 2005). Flavonoid memiliki peran dalam inhibisi pada sintesis DNA – RNA dengan interkalasi atau ikatan hidrogen dengan penumpukan asam nukleat. Letak gugus hidroksil di posisi 2',4' atau 2',6' dihidroksilasi pada cincin B dan 5,7 dihidroksilasi pada cincin A berperan penting terhadap aktivitas antibakteri flavonoid.



Gambar 2.3 Kompleks senyawa flavonoid – dinding sel bakteri (Ikatan antara flavonoid dengan struktur asam lipoteikoat pada dinding sel bakteri).

Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membrane sel adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membrane sel bakteri. Kemudian diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria *et al.*, 2009). Flavonoid dapat menghambat metabolisme energi dengan cara mengambat penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid menghambat pada sitokrom C reduktase sehingga pembentukan metabolisme terhambat. Energi dibutuhkan bakteri untuk biosintesis makromolekul (Chusnie, 2005)

2. Tanin

Toksitas tannin dapat membrane sel bakteri, senyawa astringen tannin dapat menginduksi pembentukan kompleks senyawa ikatan terhadap enzim atau substrat mikroba dan pembentukan kompleks ikatan tannin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tannin. Efek antibakteri tannin melalui reaksi dengan membrane sel, inaktivasi enzim, dan inaktivasi materi genetik. Mekanisme kerja tannin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse

transcriptase dan DNA polymerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Nuria *et al.*, 2009) tannin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi tidak sempurna. Kompleksisasi dari ion besi pada media BAP dengan tannin dapat menjelaskan toksisitas tannin. Mikroorganisme yang tumbuh di kondisi aerobik membutuhkan zat besi untuk berbagai fungsi (Rijayanti, 2014). Enzim reverse transcriptase dan DNA polymerase yang berperan dalam pembentukan sel bakteri tidak dapat terbentuk oleh kapasitas pengikat besi yang kuat oleh tannin pada media BAP sebagai media penumbuhan bakteri (Akiyama, 2001).

2.2. Bakteri

2.2.1. Bakteri Gram-Positif dan Taksonomi

Bakteri gram-positif yang digunakan pada penelitian ini adalah *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). *B. subtilis* merupakan mikroorganisme prokariotik bersel tunggal dengan ukuran 0,5-2,5 μm x 1,2-10 μm yang memiliki bentuk sel batang (Soesanto, 2008). Beberapa *B. subtilis* dilengkapi flagel atau sebagai alat penggerak. Dinding sel *B. subtilis* memiliki ketebalan 33 nm, yang tersusun dari beberapa lapis peptidoglikan. Morfologi *B. subtilis* dapat dilihat pada Gambar 2.2.



A

B

Gambar 2.4 Bakteri *Bacillus subtilis* (A) Biakan *B. subtilis* pada media BAP (dokumentasi pribadi pada tanggal 10 Maret 2019) dan (B) *Scanning Electron Microgram* (SEM) dari *Bacillus subtilis* (Radzali *et al.*, 2017)

Struktur dinding sel bakteri gram positif lebih tebal jika dibandingkan dengan bakteri gram negatif yaitu mencapai 15-80 nm. Dinding sel *Bacillus subtilis* tersusun oleh komponen utama berupa peptidoglikan. Peptidoglikan ini terdiri dari subunit polisakarida N-asetilglukosamin dan N-asam-asetilmuramik dengan rantai 1,4 β -peptidoglikan yang merupakan suatu polimer polisakarida yang saling tergabung (Coleman & Smith, 2014). Peptidoglikan memiliki aktivitas endotoksin seperti merangsang pelepasan sitokin oleh makrofag, aktivitas komplemen dan agregasi trombosit (Sandle, 2016).

Selain mengandung peptidoglikan dan polimer polisakarida, dinding sel gram positif juga mengandung komponen lain dari fosfat yang terdiri dari polimer asam teikoat dan asam teikuronik (Coleman & Smith, 2014). Asam teikoat mencakup seluruh dinding sel. Terdapat dua jenis asam teikoat yaitu (1) WTA (*Wall Teichoic Acid*) yang berikatan secara kovalen dengan peptidoglikan, dan membran asam teikoat yang berikatan secara kovalen dengan glikolipid. (2) LTA (*Lipoteic Acid*), peptidoglikan, WTA, dan LTA membentuk jaringan matriks yang berkaitan dengan elastisitas, daya serap, daya renggang dan elektrostatis selubung (Jawetz *et al.*, 2001).

B. subtilis termasuk jenis bakteri anaerob fakultatif, dimana dapat tumbuh dengan atau tanpa adanya oksigen. *B. subtilis* tumbuh optimum pada suhu 10-60oC serta pH optimum pertumbuhan antara 5-10 (Bergey, 2009).

Klasifikasi dari bakteri *Bacillus subtilis* adalah sebagai berikut:

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

(Kosim & Putra, 2010)

B. subtilis memiliki kemampuan sporulasi membentuk sel endospora berbentuk oval. Kemampuan ini penting bagi *B. subtilis* untuk bertahan hidup di lingkungan yang tidak menguntungkan. Bakteri ini dapat menghasilkan enzim proteolitik yang disebut subtilisin dan dapat membentuk spora (Elifah, 2010). Pembentukan endospora dapat membuat *B. subtilis* memiliki kemampuan untuk

bertahan hidup di kondisi ekstrim, endospora ini resisten terhadap panas, radiasi, garam, dehidrasi dan desinfektan (Pedraza *et al.*, 2012). *B.subtilis* memiliki eksoporiium bersifat hidrofobik dan spora mengandung lipid, karbohidrat dan protein sehingga dapat tahan dalam kondisi ekstrim (Bernardeau *et al.*, 2017).

2.2.2. Bakteri Gram-Negatif dan Taksonomi

Bakteri gram-negatif yang digunakan pada penelitian ini adalah *Escherichia coli* (*E. coli*). *E. coli* termasuk mikroorganisme prokariotik bersel tunggal, memiliki bentuk batang, dan tidak membentuk spora (Jawetz *et al.*, 2012). Bakteri ini memiliki ukuran 1,1-1,5 x 2,0-6,0 μm , bergerak dengan menggunakan flagella peritrik (Scheutz *et al.*, 2015). *E. coli* memiliki lapisan dinding sel yang tersusun dari 1-3 lapis peptidoglikan. Bakteri gram-negatif memiliki struktur dinding sel berlapis tiga yaitu lapisan luar berupa lipoprotein, lapisan tengah yang berupa peptidoglikan dan lapisan dalam berupa lipopolisakarida (Moningka *et al.*, 2015).

Berdasarkan struktur antigennya *E. coli* memiliki antigen somatik (O), antigen protein flagel (H), dan antigen polisakarida kapsul (K) (Mishra & Agrawal, 2012). Antigen O pada *E. coli* yang telah ditemukan saat ini berjumlah 150 tipe antigen, antigen H sebanyak 50 tipe antigen dan antigen K sebanyak 90 tipe antigen. Antigen O merupakan bagian terluar dari lipopolisakarida dinding sel yang beberapa diantaranya merupakan polisakarida yang spesifik mengandung gula. Antigen O pada *E. coli* bersifat resisten terhadap panas dan alkohol. Antigen K pada *E. coli* termasuk polisakarida dan berhubungan dengan tingkat virulensi bakteri (Jorgensen *et al.*, 2015).



A

B

Gambar 2.5. *Escherichia coli* (A) Biakan *E. coli* pada media Macconkey (dokumentasi pribadi pada tanggal 10 Maret 2019) dan (B) *Scanning Electron Microgram* (SEM) dari *Escherichia coli* (Yinfeng *et al.*, 2014)

Bakteri *E. coli* termasuk bakteri golongan *Enterobacteriaceae* yang sifatnya anaerob fakultatif (Pommerville, 2011 & Elfidasari *et al.*, 2011). Seperti golongan *Enterobacteriaceae* yang lain *E. coli* tidak dapat memproduksi sitokrom oksidase dan dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit (Mahon, 2015).

Bakteri *E. coli* termasuk jenis bakteri yang dapat tumbuh di media manapun. Bakteri *E. coli* tumbuh baik pada agar Mac Conkey dengan koloni berbentuk bulat dan cembung (Brooks *et al.*, 2010). *E. coli* termasuk bakteri yang rentan terhadap suhu tinggi. Suhu optimum untuk pertumbuhan *E. coli* yang patogen adalah 35oC-37oC. Bakteri ini juga tumbuh optimum pada kisaran pH 4,4-8,5 (Hawa, 2011).

Klasifikasi dari bakteri *E. coli* adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Prokaryotae*
 Divisi : *Gracilicutes*
 Kelas : *Scotobacteria*
 Ordo : *Eubacteriales*
 Famili : *Enterobacteriaceae*
 Genus : *Escherichia*
 Spesies : *Escherichia coli*
 (Brooks *et al.*, 2010)

2.3 Uji Anti Bakteri

2.3.1 Definisi

Uji aktivitas antibakteri merupakan uji pengaruh antibiotik tertentu terhadap kepekaan bakteri yang menyebabkan patogen, dalam hal ini yang diuji adalah ekstrak daun tebu (*Saccharum officinarum*L). Tujuan dari uji pengaruh antibiotik terhadap kepekaan bakteri adalah menentukan apakah suatu bakteri resisten terhadap antibakter. Penentuan aktivitas antibakteri suatu ekstrak tanaman dapat dilakukan apabila terpenuhi tiga syarat, yaitu (1) ekstrak tanaman harus bisa kontak dengan dinding sel mikroorganisme, (2) kondisi pengujian diatur sedemikian rupa sehingga mikroorganisme dapat tumbuh saat tidak ada bahan antimikroba, dan (3) terdapat parameter ukur tingkat pertumbuhan mikroorganisme (Rosyad, 2012).

Mekanisme kerja antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri dibagi menjadi beberapa cara yaitu (1) dengan cara menghambat sintesis dinding sel dengan cara mengganggu berbagai proses enzimatik bakteri sehingga pembentukan dinding sel terhambat dan kehilangan bentuk sel kemudian menyebabkan lisis. (2) mengubah permeabilitas membran sehingga dengan rusaknya membran akan menyebabkan terganggunya fungsi dalam mengatur keluar masuknya zat antar sel dengan lingkungan luar, (3) mengendalikan susunan dalam sel maka komponen penting dalam sel keluar dan menyebabkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel, (4) menyebabkan terjadinya denaturasi protein dan menghambat kerja enzim di dalam sel sehingga dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme dan matinya sel (Jawetz, 2001 & Tenover, 2006).

2.3.2 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi

Metode difusi cakram merupakan penentuan aktivitas pada kemampuan difusi dari zat antimikroba dalam lempeng agar yang telah diinokulasi oleh mikroba uji. Hasil pengamatan yang akan diperoleh berupa ada atau tidaknya zona hambatan yang akan terbentuk disekeliling zat antimikroba (CLSI, 2016). Pada metode difusi dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu metode kertas cakram, metode silinder dan metode lubang sumuran (Kusmayati dan Agustini, 2007).

a. Metode kertas cakram

Metode kertas cakram adalah suatu metode uji sensitivitas menggunakan kertas saring berbentuk cakram yang direndam dengan berbagai konsentrasi bahan uji antibakteri. Kemudian kertas saring tersebut diletakkan diatas permukaan media agar selektif yang telah ditambahkan suspensi biakan bakteri. Selanjutnya dinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C (Putri *et al.*, 2016). Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri. Zona hambat yang terbentuk menunjukkan kepekaan bakteri uji terhadap bahan antibakteri tersebut (Ariyanti *et al.*, 2012). Menurut CLSI (2016) efektivitas suatu zat antibakteri bisa diklasifikasikan pada tabel berikut:

Tabel 2.1 Klasifikasi Efektivitas Zat Antibakteri

No	Diameter Zona Terang	Respon HambatanPertumbuhan
1.	>18 mm	Kuat
2.	14 -17 mm	Sedang
3.	≤ 13 mm	Lemah
4.	<10 mm	Tidak ada

Metode cakram disk atau cakram kertas mempunyai kelebihan dan kekurangan. Kelebihannya adalah teknik yang digunakan sederhana sehingga tidak memerlukan peralatan khusus, kategori untuk hasil pengamatan mudah ditafsirkan oleh peneliti dan pemilihan cakram disk untuk pengujian fleksibel. Selain itu jumlah larutan zat yang terserap dapat diatur sesuai dengan kapasitas cakram, dan tergantung dari diameter serta ketebalan cakram (Kumala dan Desi, 2009). Kekurang dari metode ini adalah ukuran zona bening yang terbentuk tergantung pada kondisi inkubasi, inokulum, predifusi dan preinkubasi serta ketebalan medium. Apabila keempat faktor tersebut tidak sesuai maka hasil dari metode cakram disk biasanya sulit untuk diinterpretasikan.

b. Metode Silinder (Ditch)

Metode silinder adalah suatu metode pengujian dengan cara meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari besi tahan karat diatas media agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri (Putri *et al.*, 2016). Silinder/lempeng tersebut berisi

zat antimikroba, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu optimum yang sesuai untuk mikroba uji. Hasil pengamatan yang akan diperoleh berupa ada tidaknya zona hambat yang akan terbentuk disekitar silinder.

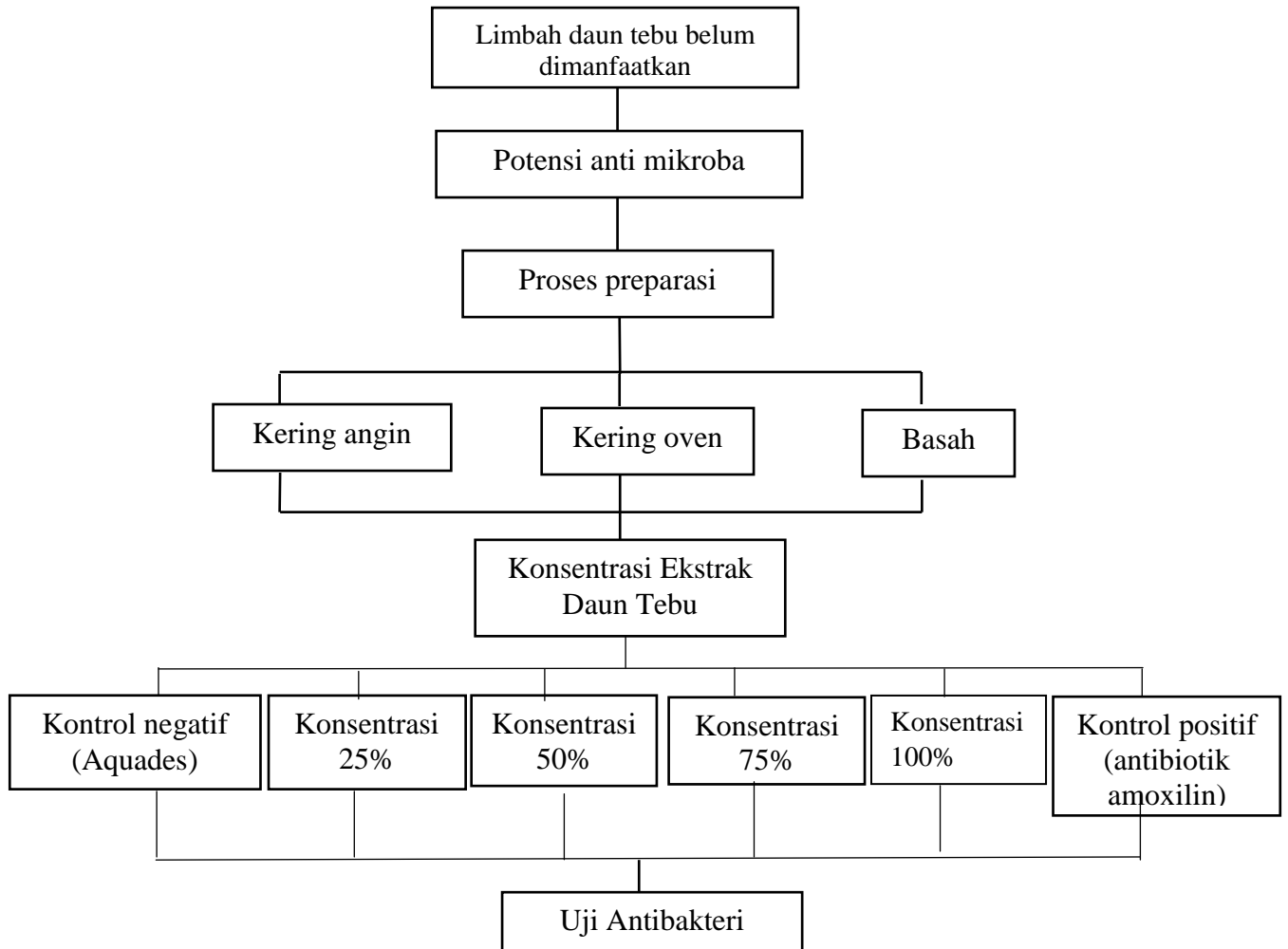
c. Metode Lubang Sumuran (Hole/cup)

Metode lubang sumuran adalah metode dengan membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasikan dengan bakteri. Kemudian lubang diinjeksikan dengan ekstrak/sampel yang akan diuji. Setelah diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai dengan mikroba uji, dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambatan di sekeliling lubang (Kusmayati dan Agustini, 2007).

Keuntungan metode difusi adalah teknik yang digunakan sederhana sehingga tidak memerlukan peralatan khusus, kategori untuk hasil pengamatan mudah ditafsirkan oleh peneliti dan pemilihan disk untuk pengujian fleksibel.

Kelemahan metode difusi adalah hasil data yang diperoleh berupa data kualitatif dalam kategori kerentanan (rentan, intermediet dan resisten) karena hanya akan menunjukkan ada atau tidaknya zona hambat atau senyawa dengan aktivitas antibakteri. Jika cakram disk tidak didistribusikan secara merata akan terjadi tumpang tindih sehingga zona inhibisi sekitar cakram antibakteri tidak dapat ditentukan (Jorgensen, 2009). Metode difusi dipengaruhi oleh faktor fisik dan kimia yaitu interaksi antara obat dan organisme, sifat medium, kemampuan difusi, ukuran molekuler dan stabilitas obat (Jawetz *et al.*, 2001).

2.4 Kerangka Berfikir



Gambar 2.6 Kerangka Berfikir

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Biokimia, Gedung D11 lantai 1 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada April 2018 – Januari 2020

3.3 Sampel Penelitian.

Sampel penelitian berupa bakteri gram-positif *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan bakteri gram-negatif *Escherichia coli* ATCC 25922. Kedua bakteri diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Daun tanaman tebu varietas VMC 86-550 yang telah diekstrak dengan metode preparasi basah, kering angin dan kering oven.

3.4 Variabel Penelitian

a. Variabel Terikat

Diameter daya hambat ekstrak daun tebu dari setiap proses preparasi daun dan konsentrasi terhadap bakteri *E.coli* dan *B.subtilis*.

b. Variabel Bebas

Proses preparasi daun yang telah dikeringkan menggunakan oven, dengan kering angin dan tanpa pengeringan, serta konsentrasi ekstrak daun tebu yaitu 25%, 50%, 75%, dan 100%.

3.5 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang akan dilakukan berupa rancangan acak lengkap faktorial dengan menggunakan 2 faktor yaitu:

- a. Bahan perlakuan meliputi daun tebu kering, daun tebu basah dan daun tebu yang dikeringanginkan.
- b. Konsentrasi pelarut ethanol dari, 25%, 50%, 75%, 100% kontrol negatif berupa air aquades dan kontrol positif berupa antibiotik amoxilin.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Alat-alat Penelitian

No	Nama Alat	Spesifikasi	Kegunaan
1	Beaker glass 50,100 dan 500 ml	Herma 1000 ml	Wadah pembuatan ekstrak daun tebu yang diencerkan dengan ethanol
2	Blender	Sharp	Menggiling daun tebu menjadi simplisia
3	Neraca analitik	Shimadzu	Menimbang berat daun tebu
4	Rotary evaporator		Evaporasi ekstrak
5	Magnetic stirrer	Thermo Scientific	Menghomogenkan larutan ekstrak daun tebu dengan pengaduk dan pemanasan
6	Gelas ukur	Herma 1000 ml	Tempat untuk mengukur cairan dalam penelitian
7	Oven	Memmert	Mengeringkan daun tebu saat pembuatan ekstrak
8	Mesh 60	ABM LBQ3	Menyaring ekstrak daun tebu
9	Tabung reaksi	Herma	Membungkus bahan
12.	Gunting dan pisau		Memotong daun
13.	Kertas saring	Whatmann filter paper	Menyaring ekstrak daun tebu
14.	Autoclaf	Hiclave HL series	Mensterilkan alat dan bahan
15.	Cooler suhu -20°C	Sharp	Penyimpanan cakram disk dan media pertumbuhan bakteri.
16.	Gelas vial 100 ml		Wadah larutan baku dan ekstrak kering
17.	Laminar air flow	Biobase	Tempat untuk melakukan inokulasi bakteri.
18.	Mikropipet dan tip	Eppendorf Research plus	Memindahkan bakteri hasil pengenceran
19.	Inkubator suhu	Memmert	Penyimpanan kultur bakteri <i>E. coli</i> dan <i>B. subtilis</i>
20.	Pipet tetes		Memindahkan cairan
21.	Ose		Mengambil atau memindah koloni bakter ke media
22.	Jangka Sorong	Vernier caliper	Mengukur diameter zona hambat ekstrak daun tebu
23.	Petridish	Normax	Tempat untuk perkembangan bakteri uji.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 3.2

Tabel 3.2 Bahan-bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Spesifikasi	Kegunaan
1	Daun tebu	varietas NXI 1-3	Sampel bahan uji
2	Bakteri <i>Eschericia coli</i> dan	ATCC 25922	Bakteri uji
3	Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Bakteri uji
4	Etanol	96% teknis	Mengekstrak dan persiapan sampel ekstrak
5	MHA (Mueler Hintlon Agar)	PP1257P90	Media uji aktivitas antibakteri
6	MacConkay No. 3 Agar	PP1214P90	Media pertumbuhan <i>E. coli</i>
7	Blood Agar	PP1325P90 TSA Sheep	Media pertumbuhan <i>B. subtilis</i>
8	Cakram kertas berdiameter 6 mm	Oxoid	Pengujian antimikroba

3.7 Prosedur penelitian

3.7.1. Proses preparasi, ekstraksi dan fraksinasi

Pada tahap ini yang akan dilakukan adalah (1) Preparasi daun tebu dalam 3 sediaan, (2) Ekstraksi daun tebu dengan metode maserasi dan (3) Fraksinasi dengan menggunakan pelarut aquades. Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan 2 faktor yaitu jenis sediaan dan konsentrasi ekstrak. Jenis sediaan adalah kering angin, kering oven dan basah. Konsentrasi ekstrak yaitu 25%, 50%, 75%, 100% kontrol negatif (aquades), dan kontrol positif (amoxilin).

Pada proses preparasi terdapat tiga metode preparasi yaitu preparasi basah, kering angin dan oven. Tujuan dari semua metode sama yaitu untuk menjaga kandungan fitokimia pada ekstrak dan juga agar dapat teramati saat dilakukan uji analisis. Daun tebu diambil dari daun tebu di perkebunan dekat PG Rendeng Kudus. Daun ini lalu dibawa ke Laboratorium Fisiologi dan Tumbuhan UNNES. Di laboratorium, daun dicuci dan dipotong kecil-kecil sepanjang 5 cm. Selanjutnya daun dipisahkan menjadi tiga bagian dan dihitung. Satu bagian daun dikeringanginkan dengan cara diletakkan diatas kertas koran dan diratakan dalam suhu ruangan hingga kering. Satu bagian daun dikering ovenkan dengan cara diletakkan ke dalam oven dengan suhu 50°C hingga kering. Kondisi kering yang dimaksud dari keadaan diatas adalah hingga bisa dipatahkan dengan mudah. Satu

bagian daun direndam ke aquades lalu dikeringkan terlebih dahulu. Preparasi ini kemudian disebut sebagai preparasi basah.

Proses selanjutnya adalah ekstraksi. Ekstraksi adalah pemisahan bagian tanaman yang aktif secara medis menggunakan pelarut selektif melalui prosedur standar untuk memisahkan metabolit sekunder dan residunya. Proses ekstraksi diawali dengan menghaluskan limbah daun tebu yang telah diberi perlakuan sediaan. Limbah daun tebu hasil sediaan dihaluskan menggunakan dry mill hingga berbentuk serbuk dan ditimbang. Selanjutnya dalam proses maserasi berupa perendaman filtrat direndam dalam etanol dengan perbandingan 1:10 selama 3 hari sehingga diperoleh ekstrak tebu. Masing – masing ekstrak dipekatkan dengan alat rotary evaporator pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental. Variabel yang dihitung adalah persentase ekstrak dan berat ekstrak secara terpisah (Vongsak, 2013). Fraksinasi dengan menggunakan pelarut aquades. Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan 2 faktor yaitu jenis sediaan dan konsentrasi ekstrak. Jenis sediaan adalah kering angin, kering oven dan basah. Konsentrasi ekstrak yaitu 25%, 50%, 75%, 100%, kontrol negatif (aquades), dan kontrol positif (amoxilin).

3.7.2. Tahap pengujian antimikroba

Pengujian antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram. Prosedur penelitian yang akan dilakukan meliputi:

- a. Pengujian antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode disk diffusion dengan media MHA di dalam petri dish. Setiap petri dish terdapat 6 cakram kertas yang sudah direndam dengan larutan ekstrak maupun kontrol yang.
- b. Pertama-tama ekstrak daun tebu yang telah disiapkan dilarutkan dengan air dalam lima jenis konsentrasi uji 25%, 50%, 75%, dan 100% (berat volume).
- c. Selanjutnya cakram direndam dalam ekstrak dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100% dan kontrol positif. Ditunggu satu jam hingga larutan ekstrak meresap ke dalam cakram.
- d. Peletakkan cakram di media pertumbuhan bakteri setelah bakteri berumur 1 hari dengan cara cakram kertas yang telah direndam ekstrak dengan

konsentrasi berbeda selama satu jam dan antibiotik diletakkan secara teratur pada permukaan media uji dengan menggunakan pinset.

- e. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam dan dalam suhu 34°C dengan 3 kali pengulangan.
- f. Pengukuran zona hambat dengan cara mengurangi diameter hasil pengukuran daerah bening dengan diameter kertas cakram.

3.8. Metode Pengumpulan Data

Data yang diperoleh dari pengujian antibakteri terhadap bakteri gram-positif *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan bakteri gram-negatif *Escherichia coli* 25922 melalui berbagai konsentrasi ekstrak daun tebu pada media merupakan data kuantitatif dengan pengumpulan data melalui cara eksperimen. Data kuantitatif berupa diameter dari zona hambat yang terlihat pada *petridish* yang telah diamati. Data kemudian dicatat sebagai data pengamatan.

3.9 Analisis Data

Uji Analisis of Variance (ANOVA) dua arah (*two-way analysis of varian*). *Two way anova* disebut juga *multivariate anova*. *Two way anova* digunakan untuk menguji banyak kelompok sampel yang melibatkan klasifikasi ganda (lebih dari satu variabel dependen).

Tabel 3.3 Tabel data perlakuan untuk masing-masing uji antibakteri dari 2 perlakuan konsentrasi preparasi dan sampel ditulis dalam satuan mm sebagai diameter daya hambat

No	Konsentrasi Ethanol	Preparasi Daun Tebu					
		Basah		Kering Angin		Kering Oven	
		<i>E.Coli</i>	<i>B.Subtilis</i>	<i>E.Coli</i>	<i>B.Subtilis</i>	<i>E.Coli</i>	<i>B.Subtilis</i>
1.	Kontrol negatif						
2.	25%						
3.	50%						
4.	75%						
5.	100%						
6.	Kontrol positif						

Keterangan: Kontrol negatif menggunakan aquades

Kontrol positif menggunakan antibiotik amoxilin

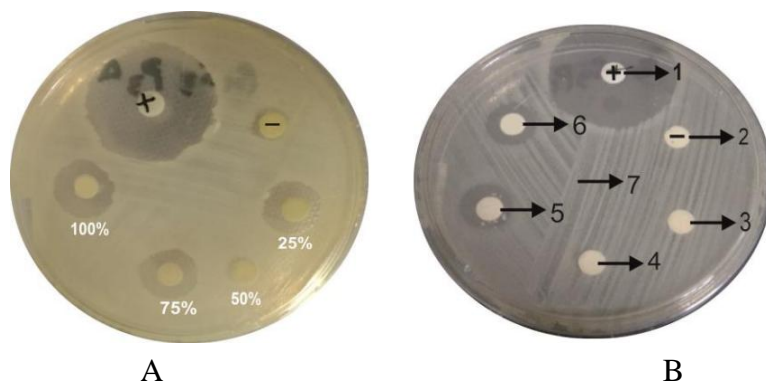
BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

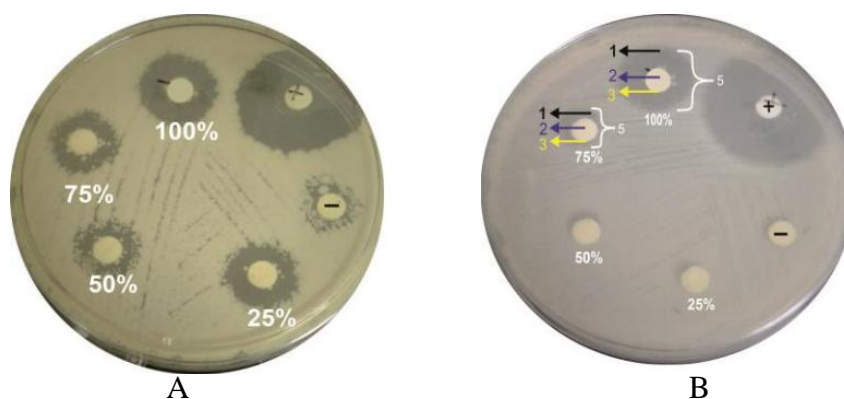
4.1.1. Hasil Uji Antibakteri Daun Tebu Terhadap Bakteri *E.coli* dan *B. subtilis*

Pengujian konsentrasi 0% dengan menggunakan aquades steril dan kontrol positif dengan menggunakan amoxilin pada media *Mueller Hintlon Agar* (MHA) dan *Blood Agar Plate* (BAP). Hasil pengujian besar zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* pada media *Mueller Hintlon Agar* (MHA) dan *Blood Agar Plate* (BAP) yang tercantum dalam Gambar 4.1

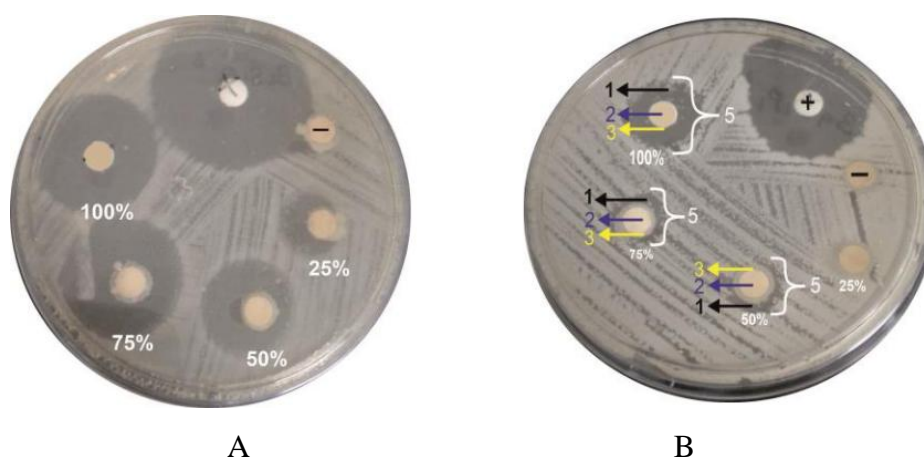


Gambar 4.1 Zona hambat ekstrak daun tebu preparasi daun basah terhadap bakteri (A) *Escherichia coli* dan (B) *Bacillus subtilis*

Keterangan: (1) Kontrol Positif (amoxilin), (2) Konsentrasi 0%, (3) Konsentrasi 25%, (4) Konsentrasi 50%, (5) Konsentrasi 75%, (6) Konsentrasi 100% dan (7) Media *Mueller Hintlon Agar*.



Gambar 4.2 Zona hambat daun tebu preparasi daun kering oven dengan berbagai tingkat konsentrasi terhadap (A) *Escherichia coli* dan (B) *Bacillus subtilis*



Gambar 4.3 Zona hambat daun tebu preparasi daun dikering anginkan dengan berbagai tingkat konsentrasi ekstrak tebu terhadap pertumbuhan bakteri (A) *Escherichia coli* dan (B) *Bacillus subtilis*

Keterangan: (1) Zona hambat (Zona Bening), (2) Cakram yang diberi kontak ekstrak tebu

4.2 Hasil Uji *Two-Way Anova*

Hasil penelitian dilakukan analisi berupa uji *Two-Way Anova* untuk mengetahui pengaruh tingkat konsentrasi ekstrak polar daun tebu dan sediaan daun tebu terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa untuk ekstraksi dengan perlakuan preparasi daun segar, kering angin, dan kering oven menunjukkan data

terdistribusi normal. Distribusi data dikatakan normal karena hasil pengujian Kolmogorov–Smirnov menunjukkan nilai p (Asymp. Sig.) $> \alpha = 0,05$. Sedangkan pada hasil uji anova, jika data nilai F hitung $> F$ tabel dengan taraf signifikansi 5% maka nilai dinyatakan signifikan sehingga dapat berpengaruh. Pada uji two way anova data dikatakan terdapat perbedaan yang signifikan jika data nilai sig. $<0,05$. Sedangkan pada uji ANOVA menunjukkan nilai signifikansi kurang dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan atau interaksi yang signifikan antara tingkat konsentrasi dengan jenis sediaan daun tebu terhadap besar diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Dengan demikian dilakukan uji lanjut *Post Hoc* dengan menggunakan uji *Tukey*.

Uji *Tukey* taraf signifikansi 5% ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan signifikan dari konsentrasi ekstrak dan jenis sediaan daun tebu terhadap diameter zona hambat bakteri *Bacillus subtilis*. Hasil uji *Tukey* yang dilakukan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada semua kelompok baik pada perlakuan jenis sediaan maupun pada tingkat konsentrasi. Sehingga dapat diketahui bahwa senyawa polar daun tebu dengan perlakuan jenis sediaan dan tingkat konsentrasi belum mampu menyamai kemampuan kontrol positif (amoxilin) dalam menghambat bakteri *Bacillus subtilis*. Berikut hasil dari uji *Tukey* yang dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Uji beda *Tukey* Diameter Zona Hambat *B. subtilis* yang Terbentuk dengan Konsentrasi negatif dan Kontrol Positif

No	Konsentrasi Etanol	Preparasi Daun Tebu		
		Basah	Kering Angin	Kering Oven
1.	Konsentrasi 0% (Aquadest)	0 ^a	0 ^a	0 ^a
2.	25%	3 ^d	7,33 ^c	6,33 ^e
3.	50%	1,66 ^d	8,66 ^c	9 ^e
4.	75%	4,66 ^d	13 ^c	9,66 ^e
5.	100%	10,33 ^f	15,66 ^g	10,66 ^h
6.	Kontrol Positif	17,66 ^b	19 ^b	18,33 ^b

Keterangan: Bilangan yang mempunyai huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda signifikan

Pada hasil dari uji *Tukey* menunjukkan bahwa tidak semua tingkat konsentrasi terdapat perbedaan yang signifikan. Pada hasil uji *Tukey* antara konsentrasi 0% dengan tingkat konsentrasi 25% tidak menunjukkan perbedaan

yang berarti sedangkan antara konsentrasi 50%, 75% dan 100% menunjukkan perbedaan yang berarti. Sehingga dapat diketahui bahwa senyawa polar daun tebu pada tingkat konsentrasi 50%, 75% dan 100% menunjukkan potensi dalam menghambat bakteri *Bacillus subtilis* sedangkan pada tingkat konsentrasi 25% tidak.

Tabel 4.2. Hasil Uji beda Tukey Diameter Zona Hambat *Escherichia coli* yang Terbentuk dengan Konsentrasi negatif dan Kontrol Positif

No	Konsentrasi Etanol	Preparasi Daun Tebu		
		Basah	Kering Angin	Kering Oven
1.	Konntol negatif (Aquadex)	0 ^a	0 ^a	0 ^a
2.	25%	0,33 ^d	1 ^c	0,66 ^c
3.	50%	0 ^d	3 ^c	1,33 ^e
4.	75%	2 ^d	4 ^c	0,33 ^e
5.	100%	4,33 ^f	7 ^g	1,33 ^h
6.	Kontrol Positif	16,33 ^b	15 ^b	14,66 ^b

Keterangan: Bilangan yang mempunyai huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda signifikan

Pada hasil uji tukey antara konsentrasi 0% dengan tingkat konsentrasi 25% tidak menunjukkan perbedaan yang berarti sedangkan tingkat konsentrasi 50%, 75% dan 100% menunjukkan perbedaan yang berarti, sehingga dapat diketahui bahwa senyawa polar daun tebu pada tingkat konsentrasi 50%, 75% dan 100% menunjukkan potensi dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* sedangkan pada tingkat konsentrasi 25% tidak. Hasil uji Tukey yang dilakukan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada semua kelompok baik pada perlakuan jenis sediaan maupun pada tingkat konsentrasi, sehingga dapat diketahui bahwa ekstrak daun tebu dengan perlakuan jenis sediaan dan tingkat konsentrasi belum mampu menyamai kemampuan kontrol positif (amoxilin) dalam menghambat bakteri *Escherichia coli*.

4.3 Pembahasan

4.3.1 Preparasi Daun Tebu

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak senyawa polar dari daun tebu terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*.

Metode preparasi yang digunakan yaitu metode preparasi basah, dikering anginkan dan oven. Kandungan bahan aktif pada tanaman sangat dipengaruhi oleh proses pengeringan. Setiap jenis tanaman mempunyai respon yang berbeda terhadap suhu tinggi, ada beberapa tanaman yang peka terhadap penyinaran matahari langsung serta suhu yang terlalu tinggi. Pengeringan yang tepat akan menghasilkan mutu simplisia yang tahan disimpan lama dan tidak terjadi perubahan bahan aktif yang dikandungnya. Pengeringan dengan dikering anginkan merupakan cara yang paling baik dalam menghasilkan senyawa fenol (metabolit sekunder) paling tinggi, sebaliknya pengeringan dengan menggunakan oven penurunan jumlah senyawa fenol sampai 50% pada suhu pengeringan 55⁰C (Almasyhuri, 2012). Ho (1992) mengatakan bahwa pengeringan mendekati suhu 60% mengakibatkan penurunan kandungan senyawa fenol. Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa kelompok perlakuan daun tebu yang dikering anginkan memiliki zona hambat yang paling tinggi.

4.3.2 Ekstrak daun tebu

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan dan murah untuk mendapatkan minyak esensial dan senyawa bioaktif yang terdiri dari beberapa langkah berupa penghancuran, perendaman dan penguapan pelarut dengan suhu tertentu agar senyawa antibakteri yang ada didalamnya tidak rusak. (Azmir *et al.*, 2013, p.428). Faktor yang dapat mempengaruhi jumlah senyawa antibakteri yang terekstraksi adalah sifat kepolaran pelarut.

Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut pada ekstraksi senyawa bioaktif banyak dilakukan karena etanol lebih mudah untuk menembus membran sel untuk mengesktrak bahan intraseluler dari bahan tumbuhan. Menurut Savitri (2014), flavonoid adalah senyawa polar, maka flavonoid umumnya larut dalam pelarut etanol, metanol, butanol, aseton, dimetil sulfoksida, dan dimetil formamida. Menurut Harbone (1987) mengatakan bahwa flavonoid merupakan senyawa polar sehingga dapat larut dalam pelarut polar (etanol).

Hasil uji ekstrak daun tebu konsentrasi 100% menunjukkan konsentrasi yang mempunyai daya hambat paling efektif terhadap bakteri *E. coli* dibandingkan ekstrak daun tebu konsentrasi 25%, 50% dan 75%. Dari keempat jenis konsentrasi sangat berpengaruh terhadap kecepatan laju reaksi difusinya. Semakin sedikit pelarutnya dan semakin banyak ekstrak daun tebu yang dilarutkan, maka sangat berpengaruh terhadap kekentalan pada larutan konsentrasi ekstrak daun tebu. Makin besar ukuran partikel maka akan semakin lambat kecepatan laju reaksi ekstrak daun tebu dalam menghambat bakteri *E.coli*. Sehingga kecepatan laju difusi semakin rendah (Kurnianti, 2013).

4.3.3 Uji Antibakteri

Pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa besar diameter zona hambat tertinggi bakteri *E. coli* pada konsentrasi 100% sebesar 15,66 mm, dan konsentrasi 25% yang paling kecil diameter zona hambat yaitu sebesar 3 mm. Besar zona hambat pada konsentrasi 0% tidak ditemukan dan zona hambat pada kontrol positif sebesar 19 mm. Sedangkan diameter zona hambat tertinggi bakteri *B. subtilis* pada konsentrasi 100% sebesar 7 mm dan konsentrasi 25% sebesar 0,33 mm. Besar zona hambat pada konsentrasi 0% tidak ditemukan dan pada kontrol positif (amoxilin) sebesar 16,33 mm.

Hasil pengukuran zona hambat dihubungkan dengan klasifikasi zona hambat berdasarkan CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*) pada pengujian bakteri *Escherchia coli* ATCC 25292 dan *Bacilus subtilis* memiliki kriteria dengan zona hambat sebagai berikut: R (*Resistant*) : ≤ 13 mm, I (*Intermediate*) : 14-17 mm, dan S (*Susceptibility*): ≥ 18 mm (CLSI, 2016). Hasil penelitian pada bakteri *Escherchia coli* ATCC 25292 menunjukkan bahwa konsentrasi 25% bersifat *resistant* yang ditunjukkan oleh diameter zona hambat 7,33 mm, konsentrasi 50% bersifat *resistant* dengan diameter zona hambat 8,66 mm, konsentrasi 75% bersifat *resistant* dengan diameter zona hambat 13 mm, konsentrasi 100% bersifat *intermediate* dengan diameter zona hambat 15,66 mm. Sedangkan pada bakteri *B. subtilis* menunjukkan bahwa konsentrasi 25% bersifat *resistant* yang ditunjukkan oleh diameter zona hambat 1 mm, konsentrasi 50% bersifat *resistant* dengan diameter zona hambat 3 mm, konsentrasi 75% bersifat

resistant dengan diameter zona hambat 4 mm, konsentrasi 100% bersifat *resistant* dengan diameter zona hambat 7 mm.

Perbedaan besarnya zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi disebabkan karena adanya perbedaan besar kecilnya konsentrasi atau kandungan zat aktif antibakteri yang terkandung didalamnya serta kecepatan difusi bahan antibakteri kedalam medium agar. Faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi terbentuknya zona hambat adalah kepekaan pertumbuhan bakteri, reaksi antara bahan aktif dengan medium, dan suhu inkubasi. Terbentuknya zona hambat menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan terhadap *Escherichia coli* (Lestari *et al.*, 2016). Terbentuknya zona hambat pada penelitian ini menunjukkan adanya sifat antibakteri pada kontrol positif (amoxilin) maupun pada senyawa yang terkandung di dalam ekstrak polar daun tebu. Sedangkan pada aquades steril tidak terbentuk area zona radikal karena aquades tidak memiliki daya antibakteri.

Pada penelitian ini, kontrol positif (amoxilin) yang digunakan adalah amoxilin. Penggunaan amoxilin didasarkan pada CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*), pada hasil penelitian menunjukkan rata-rata zona hambat yang dihasilkan sebesar 19 mm, hal ini menunjukkan bahwa amoxilin peka terhadap bakteri *E. coli*. Sedangkan pada bakteri *B. subtilis* menunjukkan rata-rata zona hambat sebesar 15 mm, hal ini menunjukkan bahwa amoxilin bersifat *intermediate*. Amoxilin termasuk salah satu antibiotik golongan antibiotik penisilin.

Penelitian Berhe *et al.*, (2017) menyatakan bahwa penggunaan amoxilin dengan konsentrasi 25 µg/ml memiliki zona hambat sebesar 12 mm. Antibiotik amoxilin termasuk golongan bakterisida yang dapat mematikan sel bakteri (Kaur *et al.*, 2011). Amoxilin memiliki mekanisme menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan mengikat satu atau lebih penicillin-binding protein (misalnya, karboksipeptidase, endopeptidase, dan transpeptidase) pada membran sitoplasma (Castle, 2007).

Pada penelitian ini, untuk konsentrasi 0% digunakan aquades steril. Aquades steril tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Hal ini disebabkan

aquades tidak memiliki senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *B. Subtilis*. Hal ini sejalan dengan penelitian Suriaman (2017) yang menyebutkan bahwa aquades tidak menghambat pertumbuhan bakteri.

Daun tebu diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder berupa senyawa fenolik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Fenol, flavonoid, dan tanin memiliki mekanisme berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *B. subtilis*. Daun tebu terbukti memiliki senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hal tersebut berdasarkan hasil mikrofraksiasi HPLC ekstrak metanol daun tebu teridentifikasi berbagai flavon - O- dan -C- glikosida yang diketahui bahwa daun tebu bersifat antibakteri karena mengandung berbagai jenis senyawa flavonoid yang merupakan senyawa antibakteri (Singh *et al.*, 2015).

Fenol adalah senyawa bioaktif yang bersifat polar dan berperan sebagai antibakteri. Senyawa fenol membunuh sel bakteri dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan menginaktifkan enzim sehingga dinding sel mengalami kerusakan karena penurunan permeabilitas. Perubahan permeabilitas membran sitoplasma menyebabkan terganggunya transportasi ion-ion organik yang penting ke dalam sel sehingga dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel hingga terjadi kematian sel (Damayanti dan Suparjana, 2007).

Flavonoid memiliki peran dalam inhibisi pada sintesis DNA – RNA dengan interkalasi atau ikatan hidrogen dengan penumpukan asam nukleat dan dalam menghambat metabolisme energi. Senyawa ini akan mengganggu metabolisme energi dengan cara yang mirip dengan menghambat sistem respirasi, karena dibutuhkan energi yang cukup untuk penyerapan aktif berbagai metabolit dan untuk biosintesis makromolekul (Cushnie, 2005). Flavonoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak dinding sel, menonaktifkan kerja enzim, berikatan dengan adhesin, dan merusak membran sel. Gugus –OH pada flavonoid sebagai struktur yang bertanggungjawab sebagai aktivitas antibakteri (Cowan, 1999).

Senyawa tanin merupakan senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan yang bersifat sebagai antibakteri. Tanin menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengganggu fungsi sitoplasma dan membran plasma, menghambat kinerja enzim serta inaktivasi fungsi materi genetik bakteri (Min *et al.*, 2008).

Kemampuan ekstrak daun tebu dalam menghambat pertumbuhan bakteri juga dapat dipengaruhi oleh sifat dinding sel bakteri. Pada penelitian ini, ekstrak daun tebu menghasilkan daya hambat yang lebih besar pada bakteri *E. coli* dibandingkan bakteri *B. subtilis*. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak daun tebu lebih efektif pada bakteri *E. coli* yang merupakan bakteri gram negatif.

Radji (2011) menyatakan bahwa dinding sel gram positif (*B. subtilis*) terdiri atas beberapa lapis peptidoglikan yang tebal dan dapat membentuk spora untuk bertahan hidup di lingkungan yang tidak menguntungkan. *B. subtilis* memiliki eksoporiun bersifat hidrofobik dan spora mengandung lipid, karbohidrat dan protein sehingga dapat tahan dalam kondisi ekstrim (Bernardeau *et al.*, 2017). Bakteri gram negatif memiliki struktur yang dinding sel dengan satu sampai tiga lapisan peptidoglikan. Dinding sel bakteri gram negatif lebih rentan terhadap guncangan fisik seperti pemberian antibiotik atau bahan antibakteri lainnya karena hanya mengandung sedikit lapisan peptidoglikan dan tidak mengandung asam teikoat (polisakarida) (Coleman & Smith, 2014).

Hasil pengujian ekstrak etanol daun tebu terhadap bakteri *E. coli* dan *B. subtilis* menunjukkan bahwa diameter zona hambat yang terbentuk belum dapat menyamai kemampuan antibakteri dari obat amoxilin. Namun, senyawa etanol daun tebu menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap konsentrasi 0%. Hal ini menunjukkan adanya potensi senyawa etanol daun tebu dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *B. subtilis*.

Pada zona hambat yang terbentuk pada cakram kertas yang mengandung ekstrak polar daun tebu tertinggi pada kelompok perlakuan kering angin dengan konsentrasi 100% rata-rata sebesar 15,66 mm. Hambatan pertumbuhan dari bakteri *E. coli* dan *B. subtilis* pada penelitian ini berbanding lurus dengan besar tingkat konsentrasi ekstrak etanol daun tebu yang digunakan, sehingga didapatkan

bahwa semakin rendah tingkat konsentrasi senyawa polar daun tebu yang digunakan maka semakin kecil zona hambat yang terbentuk dan semakin rendah kandungan antibakterinya (Lestari *et al.*, 2016).

BAB 5

PENUTUP

5.1 Simpulan

Berdasarkan pada hasil dan pembahasan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak senyawa polar daun tebu dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*.
2. Proses preparasi ekstrak senyawa polar daun tebu berpengaruh terhadap kemampuan daya hambat bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Berdasarkan pada hasil analisis menunjukkan bahwa efek antibakteri terbaik dalam daya hambat ekstrak senyawa polar daun tebu ditemukan pada kelompok preparasi kering angin dan terendah pada kelompok preparasi kering oven.
3. Konsentrasi ekstrak senyawa polar daun tebu yang paling besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* ditemukan pada konsentrasi 100%.

5.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan metode yang tepat dalam penggunaan ekstrak daun tebu sebagai obat di masyarakat.
2. Diperlukan isolasi senyawa tertentu yang memberikan efek antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, S. R., Sabir, S. M., Ahmad, S. D., Boligon, A. A., & Athayde, M. L. 2014. Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum* L). *Food Chemistry*. 147: 10–16.
- Ambarwati, Azizah T., Sembiring L., Wahyuono S. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Actinomycetes Dari Rizosfer Padi (*Oryza Sativa*) Terhadap *Salmonella Typhosa* Dan *Staphylococcus Aureus*. *Seminar Nasional X Pendidikan Biologi FKIP UNS*. :1-6
- Almasyhuri., S. Wardatun., & L. Nuraeni. (2012). Perbedaan Cara Pengirisan dan Pengeringan Terhadap Kandungan Minyak Atsiri dalam Jahe Merah. *Bul. Penelit. Kesehat*, 40(3) : 123–129.
- Almeida, D. J. M., Salatino, A., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. 2011. Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. *Food Chemistry*, 125(2), 660–664
- Alves, V.G., A. G. Souza¹., L. U. R. Chiavelli, A. L. T. G. Ruiz, J. E. Carvalho, A. M. Pomini & C. C. Silva. (2016). Phenolic compounds and anticancer activity of commercial sugarcane cultivated in Brazil. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 88(3): 1201-1209
- Astutik, R D. 2017. *Analisis Pendapatan Dan Tingkat Risiko Usahatani Tebu (Saccharum officinarum L) (Studi di Desa Setonorejo, Kecamatan Kras, Kabupaten Kediri)*. *Jurnal Brawijaya*. 2(1): 56-65
- Berhe, S., Beyene, T., Jibat, T., Tadesse, W.F. 2017. Comparative Efficacy Evaluation of Six Brands of Amoxicillin against *S. aureus* Isolated from Subclinical Mastitic Milking Dairy Cown in Bishoftu. *Advance in Dairy Research*. 5: 1-5.
- Bernardeau B M., Lehtinen M. J. Forssten S.D., Nurminen P. 2017. Importance Of The Gastrointestinal Life Cycle Of Bacillus For Probiotic Functionality. *Journal Food Science Technology*. DOI 10.1007/s13197-017-2688-3.
- BPS. 2017. *Statiska Tebu Indonesia*. Jakarta: BPS-Statistik Indonesia
- Castle, S.S. 2007. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Netherland: *Elsevier*: 905-909.

- Chakravarti, B., Mallik, B., Chakravarti, D. N. 2016. Column Chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 6 (2): 1-6
- CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012
- Cowan, M.M. 1999. Plan Products as Antimicrobial Agent. *Clinical Microbiology Reviews*: 564-582.
- Cushnie, T.P.T., dan A.J. Lamb. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 343 – 356.
- Elfidasari, D. *et al.*, 2011. Perbandingan Kualitas Es di Lingkungan Universitas Al Azhar Indonesia dengan Restoran Fast Food di Daerah Senayan dengan Indikator Jumlah *Escherichia coli* Terlarut. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi*. 1(1)
- Elifah, E. 2010. Uji Antibakteri Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Senggani (*Melastoma candidum*) terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. *Jurnal Biologi Surakarta*.
- Faisal, M., Fatimawali., Wewengkang, D.S. 2015. Uji Kepekaan Bakteri yang Diisolasi dan Diidentifikasi dari Sputum Penderita Bronkhitis di RSUP Prof dr. R. D. Kandou Manado terhadap Antibiotik Golongan Sefalosporin (Sefiksim), Penisilin (Amoksisilin) dan Tetrasiklin (Tetrasiklin). *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT Vol. 4 No. 3*: 88-95.
- Greenwood, A, *et al.* 2010. A Prospective Survey of The Outcome of Pregnancy In Rural Area of Gambia. *Bulletin of the world Health Organization* 65(5): 635-643
- Hasanuddin, H., & Purba, E. 2016. Identifikasi Dan Antagonisme Jamur Endofit Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum L.*) Dalam Menghambat *Xanthomonas Albilineans L.* Penyebab Penyakit Vaskular Bakteri. *Pertanian Tropik*, 3(1).
- Hawa, L.C., Susilo, Bambang., Jayasari, N.E. 2011. Studi Komparasi Inaktivasi *Escherichia coli* Dan Perubahan Sifat Fisik Pada Pasteurisasi Susu Sapi

- Segar menggunakan Metode Pemanasan Dan Tanpa Pemanasan Dengan Kejut Medan Listrik. *Jurnal Keteknikan Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang*. P. 34.
- Jawetz, Melnick. et.al. 2012. Mikrobiologi Kedokteran, Alih Bahasa Aryandhito Widhi Nugroho et.al., editor edisi Bahasa Indonesia Adisti Adityaputri Edisi 25, EGC, Jakarta.
- Kaur, S.P., Rao, R., Nanda, S. 2011. A,oxicillin: A broad Spectrum Antibiotic. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(3): 33-40.
- Khudry, A.,Sidharta,B.R,Atmojo, K. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pohpohan (*Pilea trinervia w.*) Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*
- Kristantyo, Y., et al. (2016). Pengaruh Aplikasi Polimer Superabsorben pada beberapa Kadar Lengas Tanah terhadap Pertumbuhan Bibit Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum L.*). *Jurnal Plantropica*. 1(2): 1-10
- Kumala, S. dan Desi. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Ilerb (*Coleus atropuspureus* Benth) terhadap Beberapa Bakteri Gram (+) dan Bakteri Gram (-). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Jurusan Farmasi Fakultas Universitas Pancasila, Jakarta
- Kurnianti, L.F. 2013. Pengaruh Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Naa dan *Blood Agar Plate* terhadap Pertumbuhan Biji *Dendrobium Capra J.J Smith* secara Invitro. Laporan penelitian. Surabaya: Institut Teknologi 10 November: 1-9
- Kusmayati dan Agustini, N. W. R. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga (*Porphyridium cruentum*). *Biodiversitas*. 8(1) : 48-53.
- McGaw, L. J., Victor, P. B., Paul, A. S., Gerda, F., Jana, O., Jacobus, N. E., Martin, S. M. 2013. Antifungal and Antibacterial Activity and Chemical Composition of Polar and Non-polar Extract of *Athrixia phylloides* Determined Using Bioautography and HPLC. *Complementary & Alternative Medicine*. 13: 356

- Miller, J.D, dan R.A. Gilbert. 2012. Sugarcane Botany : A Brief View. Agronomy Departement, Florida Cooperative Extension Service. Intitute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. 6 hlm.
- Payet, B.; Cheong, S.; Smadja, J. 2010. Evaluation and identification of molecules responsible for the antioxidant activity of materials used in granulated sugar process. In: World Congress Of Food Science And Technology, 13, 2006, Francia
- Peoloengan, M., Chairul, Komala, I., Salmah, S., dan Susan, M.N. 2013. Aktivitas Antimikrobia dan Fitokimia Dari Beberapa Tanaman Obat. Naskah Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Fakultas Peternakan IPB, Bogor
- Putri, S. D. K., Susilowati, A., Setyaningsih, R. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kapulaga (*Amomum compactum*) Terhadap *Aeromonas hydrophila* Secara In Vitro. *Biofarmasi*. 14(1):10-18
- Radji, M. 2011. *Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta: EGC
- Risfaheri, S., Yuliani, A., Gani. 1995. Pengaruh Suhu Pngeringan terhadap Mutu Simplisia Daun Katuk (*Sauropus androgynus* Merr). *Warta PERHIPBA (Perhimpunan Peneliti Bahan Obat Alami)*. 3:2-4
- Singh. A., U. R. Lal., H. M. Mukhtar., P. S. Singh., G. Shah., & R. K. Dhawan. (2015). Phytochemical Profile of Sugarcane and Its Potential Health Aspects. *Pharmacognosy Reviews* 9(17): 49-54.
- Smith, P., & Paton, N. H. 2014. Sugarcane flavonoids. *Sugar Technology Review*, 12,117–142.
- Supriyadi. 2011. Pendidikan Bahasa Indonesia 2. Jakarta: Universitas Terbuka.
- Suriaman, E., Khasanah, S. 2017. Skrining Aktivitas Antibakteri Daun Kelor (*Moringa Oleifera*), Daun Bidara Laut (*Strychnos Ligustrina Blume*), Dan Amoxicilin Terhadap Bakteri Patogen *Staphylococcus Aureus*. *Jurnal Biota*. 3(1): 21-25.
- Tarigan, B. Y. dan J. N. Sinulingga, 2006. Laporan Praktek Kerja Lapangan di Pabrik Gula Sei Semayang PTPN II Sumatera Utara. (Laporan). Universitas Sumatera Utara, Medan.

- Uchenna, E. F., Adaeze, O. A., Steve, A. C. 2015. Phytochemical and Antimicrobial Properties of the Aqueous Ethanolic Extract of *Saccharum officinarum* L (Sugarcane) Bark. *Journal of Agricultural Science*. 7(10): 291-297.
- Zhao, Y,Chen, M., Zhao, Z., Yu,S. 2015. The antibiotic activity and mechanisme of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) extract against food-bornr pathogens. College of Light Industry and Food Sciences. South China University of Technology.
- Zulbardi, M., Sugiarti, T., Hidayati, N., & Ambar-Karto, A. 2014. Peluang pemanfaatan limbah tanaman tebu untuk penggemukan sapi potong di lahan kering. *JITV*, 19(2).

Lampiran 1. Surat Izin Penelitian



KEMENTERIAN RISTEK DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN BIOLOGI

Gedung D6, Kampus Sekaran Gunungpati Semarang 50299 Telp. (024) 8508033
Website : <http://biologi.unnes.ac.id> , Email : biologi@unnes.ac.id

Kepada
Ketua Bagian Mikrobiologi
Fakultas Kedokteran
Universitas Diponegoro

Dengan hormat.

Terkait dengan surat ijin penelitian dengan judul **“ISOLASI DAN KARAKTERISASI FITOFARMAKA BERPOTENSI SEBAGAI BAHAN ANTIMIKROBA DARI DAUN TEBU (*Saccharum officinarum*)”** yang dikeluarkan oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Negeri Semarang dengan no. 117/UN37.3.1/LT/2018, maka mahasiswa jurusan Biologi UNNES yang akan membantu pelaksanaan dan pengambilan data eksperimen di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro adalah sebagai berikut :

1. **Uswatun Khasanah (4411415041)**
2. **Khoirul Mukhtar (4411415044)**
3. **Nita Septiawijastuti (4411415051)**

Demikian lampiran keterangan pelaksanaan penelitian ini kami buat untuk dapat dikeluarkan ijin bagi mahasiswa tersebut diatas untuk melaksanakan eksperimen di laboratorium yang terkait

Atas dikabulkannya permohonan ijin ini, kami ucapkan banyak terima kasih.

Semarang, 9 Mei 2018

Ketua Jurusan Biologi

Dra. Endah Penjati, M.Si.
NIP 196511161991032001

Lampiran 2. Tabel Penyajian Data Diameter Zona Hambat (mm)

Konsentrasi ethanol	Preparasi Daun Tebu					
	Basah		Kering Angin		Kering Oven	
	E.Coli	B.Subtilis	E.Coli	B.Subtilis	E.Coli	B.Subtilis
Kontrol negatif	0	0	0	0	0	0
25%	3	0,33	7,33	1	6,33	0,66
50%	1,66	0	8,66	3	9	1,33
75%	4,66	2	13	4	9,66	0,33
100%	10,33	4,33	15,66	7	10,66	1,33
Kontrol positif	17,66	16,33	19	15	18,33	14,66

Lampiran 3. Hasil uji anova dua arah dengan uji lanjut Tukey pada taraf signifikansi 5%

1. Hasil Uji Antara Efek Subjek *Bacillus subtilis*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Diameter Zona hambat

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1558.979 ^a	15	103.932	38.082	.000
Intercept	3003.125	1	3003.125	1100.382	.000
Sediaan	148.800	2	74.400	27.261	.000
Konsentrasi	933.111	4	233.278	85.476	.000
Sediaan * Konsentrasi	176.756	8	22.094	8.096	.000
Error	87.333	32	2.729		
Total	6151.000	48			
Corrected Total	1646.313	47			

a. R Squared = .947 (Adjusted R Squared = .922)

2. Uji Normalitas untuk Data Uji Antibakteri Daun Tebu terhadap *B. subtilis*

		Tests of Normality					
Proses preparasi		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
		ic					
Standardized	kontrol Negatif	.	3	.	.	3	.
Residual for	daun segar	.229	12	.083	.916	12	.256
Diameter	daun kering	.173	12	.200*	.936	12	.449
	angin						
	daun kering	.249	12	.038	.810	12	.012
	oven						
	kontrol Positif	.197	9	.200*	.950	9	.691

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

		Tests of Normality					
Tingkat konsentrasi		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
		ic					
Standardized	kontrol Negatif	.	3	.	.	3	.
Residual for	konsentrasi 25%	.142	9	.200*	.978	9	.951
Diameter	konsentrasi 50%	.278	9	.044	.900	9	.252
	konsentrasi 75%	.169	9	.200*	.924	9	.426
	konsentrasi 100%	.341	9	.003	.829	9	.043
	kontrol Positif	.197	9	.200*	.950	9	.691

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

3. **Hasil Uji Homogenitas untuk Data Uji Antibakteri Daun Tebu terhadap *B. subtilis***

Levene's Test of Equality of Error Variances^{a,b}

		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Diameter zona hambat	Based on Mean	2.994	13	34	.005
	Based on Median	.874	13	34	.585
	Based on Median and with adjusted df	.874	13	9.827	.598
	Based on trimmed mean	2.747	13	34	.009

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Dependent variable: Diameter zona hambat

b. Design: Intercept + Sediaan + Konsentrasi + Sediaan * Konsentrasi

4. Deskripsi Statistik Hasil Uji Anova Dua Arah untuk Data Uji Antibakteri Daun Tebu terhadap *B. subtilis*

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Diameter zona hambat

Proses preparasi	Tingkat konsentrasi	Mean	Std. Deviation	N
kontrol Negatif	kontrol Negatif	.00	.000	3
	Total	.00	.000	3
daun segar	konsentrasi 25%	.33	.577	3
	konsentrasi 50%	.00	.000	3
	konsentrasi 75%	2.00	2.000	3
	konsentrasi 100%	4.33	2.082	3
	Total	1.67	2.188	12
daun kering angin	konsentrasi 25%	1.00	1.000	3
	konsentrasi 50%	3.00	3.000	3
	konsentrasi 75%	4.00	4.359	3
	konsentrasi 100%	7.00	1.732	3
	Total	3.75	3.306	12
daun kering oven	konsentrasi 25%	.67	.577	3
	konsentrasi 50%	1.33	1.155	3
	konsentrasi 75%	.33	.577	3
	konsentrasi 100%	1.33	1.155	3
	Total	.92	.900	12
kontrol Positif	kontrol Positif	15.33	1.803	9
	Total	15.33	1.803	9
Total	kontrol Negatif	.00	.000	3
	konsentrasi 25%	.67	.707	9
	konsentrasi 50%	1.44	2.068	9
	konsentrasi 75%	2.11	2.892	9
	konsentrasi 100%	4.22	2.863	9
	kontrol Positif	15.33	1.803	9
	Total	4.46	5.802	48

5. Hasil Uji Lanjut Tukey dengan Kontrol Negatif dan Kontrol Positif pada Taraf Signifikan 5% untuk Data Uji Antibakteri Daun Tebu terhadap *B. subtilis*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter zona hambat

(I) Proses preparasi	(J) Proses preparasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol Negatif	daun segar	-1.67	1.182	.626	-5.07	1.74
	daun kering angin	-3.75*	1.182	.025	-7.15	-.35
	daun kering oven	-.92	1.182	.936	-4.32	2.49
	kontrol Positif	-15.33*	1.221	.000	-18.85	-11.82
daun segar	kontrol Negatif	1.67	1.182	.626	-1.74	5.07
	daun kering angin	-2.08	.748	.062	-4.24	.07
	daun kering oven	.75	.748	.852	-1.40	2.90
	kontrol Positif	-13.67*	.807	.000	-15.99	-11.34
daun kering angin	kontrol Negatif	3.75*	1.182	.025	.35	7.15
	daun segar	2.08	.748	.062	-.07	4.24
	daun kering oven	2.83*	.748	.005	.68	4.99
	kontrol Positif	-11.58*	.807	.000	-13.91	-9.26
daun kering oven	kontrol Negatif	.92	1.182	.936	-2.49	4.32
	daun segar	-.75	.748	.852	-2.90	1.40
	daun kering angin	-2.83*	.748	.005	-4.99	-.68
	kontrol Positif	-14.42*	.807	.000	-16.74	-12.09
kontrol Positif	kontrol Negatif	15.33*	1.221	.000	11.82	18.85
	daun segar	13.67*	.807	.000	11.34	15.99
	daun kering angin	11.58*	.807	.000	9.26	13.91
	daun kering oven	14.42*	.807	.000	12.09	16.74

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter Zona hambat

Tukey HSD

(I) Tingkat Konsentrasi	(J) Tingkat Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Konsentrasi 25%	-5.56*	1.085	.000	-8.83	-2.28
	Konsentrasi 50%	-7.44*	1.085	.000	-10.72	-4.17
	Konsentrasi 75%	-8.11*	1.085	.000	-11.38	-4.84
	Konsentrasi 100%	-12.22*	1.085	.000	-15.50	-8.95
	Kontrol Positif	-18.33*	1.085	.000	-21.61	-15.06
Konsentrasi 25%	Kontrol Negatif	5.56*	1.085	.000	2.28	8.83
	Konsentrasi 50%	-1.89	.767	.164	-4.20	.43

	Konsentrasi 75%	-2.56*	.767	.023	-4.87	-.24
	Konsentrasi 100%	-6.67*	.767	.000	-8.98	-4.35
	Kontrol Positif	-12.78*	.767	.000	-15.09	-10.46
Konsentrasi 50%	Kontrol Negatif	7.44*	1.085	.000	4.17	10.72
	Konsentrasi 25%	1.89	.767	.164	-.43	4.20
	Konsentrasi 75%	-.67	.767	.951	-2.98	1.65
	Konsentrasi 100%	-4.78*	.767	.000	-7.09	-2.46
	Kontrol Positif	-10.89*	.767	.000	-13.20	-8.57
Konsentrasi 75%	Kontrol Negatif	8.11*	1.085	.000	4.84	11.38
	Konsentrasi 25%	2.56*	.767	.023	.24	4.87
	Konsentrasi 50%	.67	.767	.951	-1.65	2.98
	Konsentrasi 100%	-4.11*	.767	.000	-6.43	-1.80
	Kontrol Positif	-10.22*	.767	.000	-12.54	-7.91
Konsentrasi 100%	Kontrol Negatif	12.22*	1.085	.000	8.95	15.50
	Konsentrasi 25%	6.67*	.767	.000	4.35	8.98
	Konsentrasi 50%	4.78*	.767	.000	2.46	7.09
	Konsentrasi 75%	4.11*	.767	.000	1.80	6.43
	Kontrol Positif	-6.11*	.767	.000	-8.43	-3.80
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	18.33*	1.085	.000	15.06	21.61
	Konsentrasi 25%	12.78*	.767	.000	10.46	15.09
	Konsentrasi 50%	10.89*	.767	.000	8.57	13.20
	Konsentrasi 75%	10.22*	.767	.000	7.91	12.54
	Konsentrasi 100%	6.11*	.767	.000	3.80	8.43

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2.647.

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

Lampiran 4. Hasil uji anova dua arah dengan uji lanjut Tukey pada taraf signifikansi 5%

6. Hasil Uji Antara Efek Subjek *Eschericia coli*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Diameter Zona hambat

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1556.313 ^a	13	119.716	45.226	.000
Intercept	3095.862	1	3095.862	1169.548	.000
Sediaan	164.667	2	82.333	31.104	.000
Konsentrasi	213.111	3	71.037	26.836	.000
Sediaan * Konsentrasi	158.222	6	26.370	9.962	.000
Error	90.000	34	2.647		
Total	6151.000	48			
Corrected Total	1646.313	47			

a. R Squared = .945 (Adjusted R Squared = .924)

7. Uji Normalitas untuk Data Uji Antibakteri Daun Tebu terhadap *E. coli*

Tests of Normality

	Proses Preparasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statisti c	df	Sig.	Statist ic	df	Sig.
Standardized	Kontrol Negatif	.	3	.	.	3	.
Residual for	Daun Segar	.167	12	.200 [*]	.962	12	.817
Diameter	Daun Kering	.163	12	.200 [*]	.940	12	.500
	Angin						
	Daun Kering	.157	12	.200 [*]	.909	12	.205
	Oven						
	Kontrol Positif	.183	9	.200 [*]	.968	9	.881

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

		Tests of Normality					
Tingkat		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
Konsentrasi		Statistic	df	Sig.	Statisti	df	Sig.
		c					
Standardized	Kontrol Negatif	.	3	.	.	3	.
Residual for	Konsentrasi 25%	.167	9	.200 [*]	.935	9	.529
Diameter	Konsentrasi 50%	.253	9	.101	.921	9	.404
	Konsentrasi 75%	.191	9	.200 [*]	.917	9	.368
	Konsentrasi 100%	.155	9	.200 [*]	.954	9	.737
	Kontrol Positif	.183	9	.200 [*]	.968	9	.881

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

8. Hasil Uji Homogenitas untuk Data Uji Antibakteri Daun Tebu terhadap *E. coli*

		Levene's Test of Equality of Error Variances ^{a,b}			
		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Diameter Zona hambat	Based on Mean	1.050	13	34	.431
	Based on Median	.422	13	34	.950
	Based on Median and with adjusted df	.422	13	25.573	.947
	Based on trimmed mean	1.006	13	34	.467

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Dependent variable: Diameter Zona hambat

b. Design: Intercept + Sediaan + Konsentrasi + Sediaan * Konsentrasi

9. Deskripsi Statistik Hasil Uji Anova Dua Arah untuk Data Uji Antibakteri Daun Tebu terhadap *E. coli*

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Diameter Zona hambat

Proses Preparasi	Tingkat Konsentrasi	Mean	Std. Deviation	N
Kontrol Negatif	Kontrol Negatif	.00	.000	3
	Total	.00	.000	3
Daun Segar	Konsentrasi 25%	3.00	2.000	3
	Konsentrasi 50%	9.00	1.000	3
	Konsentrasi 75%	1.67	2.082	3
	Konsentrasi 100%	10.33	.577	3
	Total	6.00	4.112	12
Daun Kering Angin	Konsentrasi 25%	7.33	2.517	3
	Konsentrasi 50%	8.67	1.155	3
	Konsentrasi 75%	13.00	1.732	3
	Konsentrasi 100%	15.67	2.082	3
	Total	11.17	3.857	12
Daun Kering Oven	Konsentrasi 25%	6.33	1.528	3
	Konsentrasi 50%	4.67	2.082	3
	Konsentrasi 75%	9.67	1.528	3
	Konsentrasi 100%	10.67	1.528	3
	Total	7.83	2.918	12
Kontrol Positif	Kontrol Positif	18.33	1.500	9
	Total	18.33	1.500	9
Total	Kontrol Negatif	.00	.000	3
	Konsentrasi 25%	5.56	2.651	9
	Konsentrasi 50%	7.44	2.455	9
	Konsentrasi 75%	8.11	5.278	9
	Konsentrasi 100%	12.22	2.906	9
	Kontrol Positif	18.33	1.500	9
	Total	9.69	5.918	48

10. Hasil Uji Lanjut Tukey dengan Kontrol Negatif dan Kontrol Positif pada Taraf Signifikan 5% untuk Data Uji Antibakteri Daun Tebu terhadap *E. coli*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter Zona hambat

Tukey HSD

(I) Proses Preparasi	(J) Proses Preparasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Daun Segar	-6.00*	1.050	.000	-9.02	-2.98
	Daun Kering Angin	-11.17*	1.050	.000	-14.19	-8.14
	Daun Kering Oven	-7.83*	1.050	.000	-10.86	-4.81
	Kontrol Positif	-18.33*	1.085	.000	-21.46	-15.21
Daun Segar	Kontrol Negatif	6.00*	1.050	.000	2.98	9.02
	Daun Kering Angin	-5.17*	.664	.000	-7.08	-3.25
	Daun Kering Oven	-1.83	.664	.066	-3.75	.08
	Kontrol Positif	-12.33*	.717	.000	-14.40	-10.27
Daun Kering Angin	Kontrol Negatif	11.17*	1.050	.000	8.14	14.19
	Daun Segar	5.17*	.664	.000	3.25	7.08
	Daun Kering Oven	3.33*	.664	.000	1.42	5.25
	Kontrol Positif	-7.17*	.717	.000	-9.23	-5.10
Daun Kering Oven	Kontrol Negatif	7.83*	1.050	.000	4.81	10.86
	Daun Segar	1.83	.664	.066	-.08	3.75
	Daun Kering Angin	-3.33*	.664	.000	-5.25	-1.42
	Kontrol Positif	-10.50*	.717	.000	-12.57	-8.43
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	18.33*	1.085	.000	15.21	21.46
	Daun Segar	12.33*	.717	.000	10.27	14.40
	Daun Kering Angin	7.17*	.717	.000	5.10	9.23
	Daun Kering Oven	10.50*	.717	.000	8.43	12.57

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter Zona hambat

Tukey HSD

(I) Tingkat Konsentrasi	(J) Tingkat Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Konsentrasi 25%	-5.56*	1.085	.000	-8.83	-2.28
	Konsentrasi 50%	-7.44*	1.085	.000	-10.72	-4.17
	Konsentrasi 75%	-8.11*	1.085	.000	-11.38	-4.84
	Konsentrasi 100%	-12.22*	1.085	.000	-15.50	-8.95
	Kontrol Positif	-18.33*	1.085	.000	-21.61	-15.06
Konsentrasi 25%	Kontrol Negatif	5.56*	1.085	.000	2.28	8.83
	Konsentrasi 50%	-1.89	.767	.164	-4.20	.43

	Konsentrasi 75%	-2.56*	.767	.023	-4.87	-.24
	Konsentrasi 100%	-6.67*	.767	.000	-8.98	-4.35
	Kontrol Positif	-12.78*	.767	.000	-15.09	-10.46
Konsentrasi 50%	Kontrol Negatif	7.44*	1.085	.000	4.17	10.72
	Konsentrasi 25%	1.89	.767	.164	-.43	4.20
	Konsentrasi 75%	-.67	.767	.951	-2.98	1.65
	Konsentrasi 100%	-4.78*	.767	.000	-7.09	-2.46
	Kontrol Positif	-10.89*	.767	.000	-13.20	-8.57
Konsentrasi 75%	Kontrol Negatif	8.11*	1.085	.000	4.84	11.38
	Konsentrasi 25%	2.56*	.767	.023	.24	4.87
	Konsentrasi 50%	.67	.767	.951	-1.65	2.98
	Konsentrasi 100%	-4.11*	.767	.000	-6.43	-1.80
	Kontrol Positif	-10.22*	.767	.000	-12.54	-7.91
Konsentrasi 100%	Kontrol Negatif	12.22*	1.085	.000	8.95	15.50
	Konsentrasi 25%	6.67*	.767	.000	4.35	8.98
	Konsentrasi 50%	4.78*	.767	.000	2.46	7.09
	Konsentrasi 75%	4.11*	.767	.000	1.80	6.43
	Kontrol Positif	-6.11*	.767	.000	-8.43	-3.80
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	18.33*	1.085	.000	15.06	21.61
	Konsentrasi 25%	12.78*	.767	.000	10.46	15.09
	Konsentrasi 50%	10.89*	.767	.000	8.57	13.20
	Konsentrasi 75%	10.22*	.767	.000	7.91	12.54
	Konsentrasi 100%	6.11*	.767	.000	3.80	8.43

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2.647.

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

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian

Limbah daun tanaman tebu (*Saccharum officinarum L.*) dilakukan perlakuan segar, kering angin dan kering oven



Daun tanaman tebu yang telah diberi perlakuan sediaan dihaluskan



Daun tebu direndam dengan senyawa polar (air)



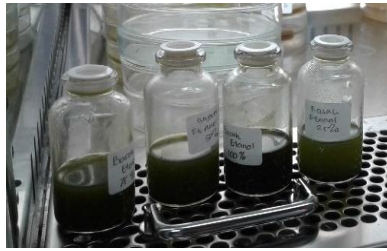
Proses penyaringan ekstrak daun tebu dengan menggunakan pipa vacum



Ekstrak polar daun tebu yang sudah terpisah dari ampasnya



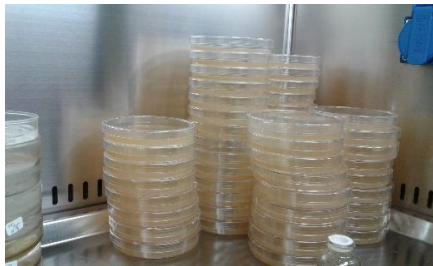
Serbuk ekstrak polar daun tebu yang sudah mengalami proses penguapan kandungan air dan penghalusan



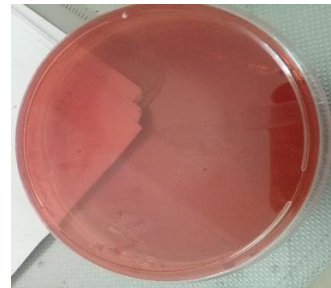
Ekstrak polar daun tebu dalam beberapa konsentrasi



Proses sterilisasi alat dan bahan



Media MHA yang sudah dituang ke dalam petridish dan dibiarkan mengeras



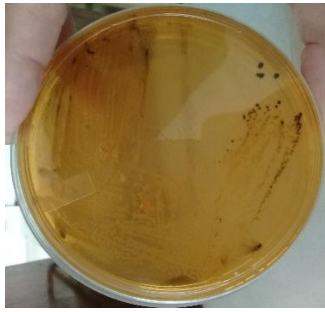
Media SS Agar untuk kultivasi bakteri *Salmonella typhi*



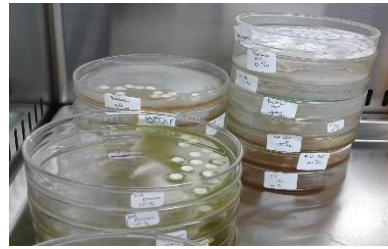
Biakan murni bakteri *Salmonella typhi*



Kultivasi bakteri *Salmonella typhi* pada medium SS Agar yang kemudian diinkubasi selama 24 jam



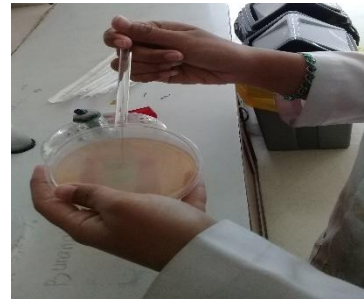
Hasil biakan bakteri *Salmonella typhi* selama 24 jam



Proses perendaman cakram kertas dalam ekstrak polar daun tebu maupun kontrol selama 1 jam



Proses pengenceran bakteri dan penyamaan dengan standart mc Farland 0.5



Penanaman bakteri *Salmonella typhi* dalam media MHA



Peletakkan cakram kertas kedalam petridish yang sudah ditanam bakteri



Proses Inkubasi bakteri selama 24 jam