

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah determinasi tanaman salam yang dilakukan di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Karanganyar. Determinasi ini bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil dengan mencocokkan ciri morfologis yang ada pada tanaman yang diteliti dengan kunci determinasi, menghindari terjadinya kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Berdasarkan surat keterangan nomor YK.01.03/2/864/2019 hasil determinasi menyatakan bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian adalah tanaman salam (*Syzygium Polyanthum* [Wight] Walp). Surat determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pembuatan simplisia dan serbuk

Daun salam yang masih segar dicuci dengan air mengalir hingga bersih kemudian ditiriskan, setelah itu daun salam dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C. Pengeringan tanaman bertujuan untuk mengurangi kandungan air pada tanaman dan menghentikan reaksi enzimatik yang dapat terjadi pada tanaman, selain itu kadar air yang terlalu tinggi dapat menjadi media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme yang akan menyebabkan pembusukan pada tanaman. Daun salam yang telah kering diserbuk kemudian hasil penyerbukan dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan menggunakan ayakan No. 40 (Lampiran 15). Penyerbukan ini bertujuan untuk memperluas permukaan partikel yang kontak dengan pelarut saat penyarian. Gambar serbuk daun salam dapat dilihat pada lampiran 2. Daun salam sebanyak 10.000 gr yang dikeringkan, diperoleh presentase bobot kering terhadap bobot basah, hasil pembuatan serbuk daun salam diperoleh presentase yang terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil presentase rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun salam

No.	Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (%)
1	10.000	1630	16,30

Pada tabel 1 menunjukkan bahwa daun salam dengan bobot basah 10.000 gram dikeringkan dan diperoleh bobot kering yaitu 1630 gram. Persentase bobot kering terhadap bobot basah sebesar 16,30%. Perhitungan persentase bobot basah terhadap bobot kering dapat dilihat pada lampiran 16.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk

Penentuan susut pengeringan daun salam menggunakan alat *Moisture balance*. Berdasarkan tabel 2, hasil penetapan kadar susut pengeringan serbuk daun salam didapatkan rata-rata sebesar 8,5 %. Kadar susut pengeringan serbuk memenuhi syarat dimana serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10% karena dengan kadar susut pengeringan kurang dari 10% sel dalam keadaan mati, enzim tidak aktif serta bakteri dan jamur tidak tumbuh sehingga bahan lebih awet (Katno *et al.* 2008). Perhitungan susut pengeringan dapat dilihat pada lampiran 17.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun salam

No	Bobot serbuk (g)	Kadar susut pengeringan (%)
1	2,00	8,50
2	2,00	8,50
3	2,00	8,50
Rata-rata		8,50

4. Pembuatan ekstrak etanol 70% daun salam

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan maserasi. Hasil maserasi diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 55°C sampai diperoleh ekstrak kental, dari 1000 gram serbuk daun salam diperoleh berat ekstrak sebanyak 197,35 gram. Perhitungan susut pengeringan dapat dilihat pada lampiran 18.

Tabel 3. Hasil persentase rendemen ekstrak terhadap serbuk daun salam

No	Bobot serbuk (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
1	1000	197,35	19,73

Besar kecilnya nilai rendemen menunjukkan efisiensi dan efektivitas pada proses ekstraksi. Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Efektivitas proses ekstraksi dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan sebagai penyari, ukuran partikel simplisia, metode dan lamanya ekstraksi. Besar kecilnya rendemen ekstrak juga

menunjukkan banyaknya komponen aktif yang terkandung di dalam ekstrak (Permawati 2008). Gambar ekstrak daun salam dapat dilihat pada lampiran 4.

5. Penetapan kadar air

Hasil penetapan kadar air ekstrak daun salam dapat diperoleh dengan cara mengukur kadar airnya dengan menggunakan alat *Sterling Bidwell* dengan melihat volume pada skala alat tersebut dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil penetapan kadar air ekstrak daun salam

Replikasi	Bobot ekstrak (g)	Volume air (ml)	Presentase (%)
1	20	1,5	7,5
2	20	1,6	8
3	20	1,6	8
Rata-rata			7,83

Presentase kadar air ekstrak daun salam diperoleh sebesar 7,83%, sehingga dari hasil tersebut kandungan kadar air ekstrak daun salam tidak lebih dari 10%. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 20.

6. Hasil pengujian bebas etanol

Ekstrak daun salam dilakukan tes bebas etanol dengan melakukan uji esterifikasi alkohol. Hasil pengujian bebas etanol ekstrak daun salam dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil tes bebas etanol ekstrak daun salam

Prosedur	Hasil	Pustaka
Ekstrak + H ₂ SO ₄ conc + CH ₃ COOH, dipanaskan	Tidak tercium bau ester	Tidak tercium bau ester (Kurniawati 2015)

Hasil pengujian bebas etanol, ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak daun salam positif bebas etanol karena tidak tercium bau ester setelah dilakukan pemanasan dengan asam asetat dan asam sulfat pekat (Lampiran 6). Tujuan dilakukan uji bebas etanol pada ekstrak daun salam adalah untuk membebaskan ekstrak etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi, serta mencegah kesalahan pengamatan dalam tahap penelitian selanjutnya yaitu pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, sebab etanol memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat mempengaruhi hasil penelitian (Kurniawati 2015).

7. Fraksinasi ekstrak daun salam

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dengan golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa non polar akan terekstraksi dalam pelarut *n*-heksan, senyawa semipolar akan terekstraksi dalam pelarut etil asetat, dan senyawa polar akan terekstraksi dalam pelarut air. Bahan aktif yang sudah terekstraksi dalam masing-masing pelarut yang sesuai dengan kepolarannya akan mudah diperkirakan kandungan kimia yang dapat digunakan sebagai antibakteri (Mukhriani 2014).

Tabel 6. Rendemen hasil fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak daun salam

Bobot ekstrak (g)	Fraksi	Bobot fraksi (g)	Persentase (%)
60	<i>n</i> -heksan	8,39	13,98
60	Etil asetat	9,01	15,01
60	Air	11,66	19,43

Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat bahwa perhitungan presentase rendemen fraksinasi fraksi *n*-heksan daun salam diperoleh persentasenya yaitu 13,98%. Fraksinasi fraksi etil asetat daun salam diperoleh persentasenya yaitu 15,01% dan fraksinasi fraksi air daun salam diperoleh persentasenya yaitu 19,43%. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air ekstrak daun salam dapat dilihat pada lampiran 20.

Hasil bobot fraksi terhadap bobot ekstrak yang diperoleh dari masing-masing fraksinasi sangat kecil. Hal ini disebabkan karena pada saat melakukan fraksinasi terjadi proses emulsi pada saat pengujian, sehingga senyawa yang dihasilkan tidak maksimal. Senyawa yang terkandung di dalam fraksi banyak yang menguap dan hilang pada saat dilakukan proses pemisahan. Hasil fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibandingkan dengan fraksi yang lain karena sebagian besar senyawa dalam daun salam bersifat polar. Rendemen setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menarik senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun salam berbeda.

8. Identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi teraktif

Serbuk, ekstrak dan fraksi teraktif daun salam yang diperoleh diidentifikasi kandungan kimia yang terkandung di dalamnya. Hasil identifikasi kandungan kimia daun salam dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk, ekstrak dan fraksi teraktif daun salam

Senyawa	Serbuk	Hasil			Pustaka	Keterangan		
		Ekstrak	Fraksi teraktif			A	B	C
Saponin	Busa stabil	Busa stabil	Busa tidak stabil		Terbentuk busa yang stabil + 1 tetes HCL 2N busa tidak hilang (Setyowati <i>et al.</i> 2014)	(+)	(+)	(-)
Flavonoid	Warna jingga	Warna jingga	Warna coklat kehijauan		Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuk warna jingga (Setyowati <i>et al.</i> 2014)	(+)	(+)	(-)
Alkaloid	Mayer: tidak terbentuk endapan	Mayer: tidak terbentuk endapan	Wagner: terbentuk warna cokelat kemerahan		Mayer : terbentuk endapan putih	(+)	(+)	(+)
	Wagner: terbentuk warna cokelat kemerahan Dragendroff: terbentuk warna jingga	Wagner: terbentuk warna cokelat kemerahan Dragendroff: terbentuk warna jingga	Dragendroff: terbentuk warna jingga		Wagner : terbentuk warna cokelat kemerahan Dragendroff : terbentuk warna jingga (Setyowati <i>et al.</i> 2012)			
Tanin	Warna hijau kehitaman	Warna hijau kehitaman	Warna hijau kehitaman		Terbentuk warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Ramyashree <i>et al.</i> 2012)	(+)	(+)	(+)

Keterangan:

A: Serbuk

B: Ekstrak

C: Fraksi teraktif

(+) : mengandung golongan senyawa

(-) : tidak mengandung golongan senyawa

Identifikasi kandungan kimia terhadap serbuk, ekstrak dan fraksi teraktif daun salam berdasarkan tabel 7 yang telah dilakukan menunjukkan bahwa serbuk daun salam mengandung senyawa saponin, flavonoid, alkaloid dan tanin. Ekstrak daun salam mengandung senyawa saponin, flavonoid, alkaloid, dan tanin. Sedangkan pada fraksi teraktif daun salam mengandung senyawa alkaloid dan tanin saja. Hasil identifikasi golongan senyawa pada serbuk, ekstrak, dan fraksi teraktif daun salam dapat dilihat pada lampiran 8.

9. Identifikasi bakteri uji

9.1. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara makroskopik. Identifikasi bakteri *E. coli* ATCC 25922 secara makroskopik dilakukan dengan cara menginokulasi bakteri dari biakan murni pada media EA (Endo Agar) yang kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan koloni berwarna merah dengan kilat logam, hal ini disebabkan *E. coli* ATCC 25922 memetabolisme laktosa dan menghasilkan aldehyd dan asam. Aldehyd akan melepaskan fuksin dari senyawa fuksin-sulfat kemudian akan mewarnai koloni merah dan akan terlihat berwarna seperti kilatan logam (Kartika *et al.* 2014). Hasil identifikasi koloni pada *E. coli* ATCC 25922 dapat dilihat pada lampiran 9.

9.2. Identifikasi mikroskopis bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri uji yang digunakan yaitu *E. coli* ATCC 25922 termasuk dalam golongan bakteri Gram negatif. Bakteri uji *E. coli* ATCC 25922 diperoleh hasil dengan warna merah, bentuk batang kecil. Kristal violet (Gram A) ditetaskan sehingga menyebabkan kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram positif dan Gram negatif. Mordant (lugol iodine/Gram B) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya ikatan dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas peningkatan zat warna oleh sel bakteri, seluruh bakteri akan berwarna biru. Gram C (alkohol) ditetaskan sehingga menyebabkan terbentuknya pori-pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks kristal violet-iodine tidak menempel pada dinding bakteri, hal ini menyebabkan sel Gram negatif akan kehilangan warna birunya. Pewarna safranin (Gram D) ditetaskan sehingga sel Gram negatif yang awalnya kehilangan warna akan memiliki warna yang kontras yaitu merah. Hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan sel berbentuk batang pendek yang warna merah. Identifikasi mikroskopis *E. coli* ATCC 25922 dengan pengecatan Gram dapat dilihat pada lampiran 10.

9.3. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 secara biokimia. Uji biokimia merupakan cara untuk mengidentifikasi suatu biakan

murni bakteri hasil inokulasi melalui sifat-sifat fisiologisnya. Identifikasi uji biokimia pada bakteri *E. coli* ATCC 25922 menggunakan media yang terdiri dari KIA, SIM, LIA, dan Sitrat. Hasil uji biokimia pada bakteri *E. coli* ATCC 25922 dapat dilihat pada tabel 8, lampiran 11.

Tabel 8. Hasil identifikasi uji biokimia pada *E. coli* ATCC 25922

Pengujian	Hasil	Pustaka (Sri 2016)
KIA	A/AG S(-)	A/AG S(-)
SIM	---	---
LIA	K/K S(-)	K/K S(-)
Sitrat	-	-

Keterangan:

- KIA : *Klinger Iron Agar*
- SIM : *Sulfida Indol Motilitas*
- LIA : *Lysine Iron Agar*
- A : Reaksi Asam
- K : Reaksi Basa
- G : Terbentuk Gas
- S : Terbentuk Sulfida (warna hitam)

Media KIA untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Hasil yang diperoleh yaitu A/AG S(-), A/A artinya pada lereng dan dasar media berwarna kuning, hal ini menunjukkan bahwa *E. coli* mampu memfermentasikan glukosa dan laktosa. Media KIA mengandung laktosa 1%, glukosa 0,1% dan *phenol red* (dalam suasana asam). KIA juga mengandung sodium thiosulfat yaitu suatu substrat penghasil H₂S. G artinya terdapat gas sehingga menyebabkan media terangkat, S (-) artinya uji *hydrogen sulfide* negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media KIA, endapan hitam ini terbentuk dari hidrogen sulfida yang akan bereaksi Fe⁺⁺. Hidrogen sulfida terbentuk karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan methion (Sri 2016).

Media SIM digunakan untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pengujian SIM menunjukkan hasil sulfida negatif, artinya *E. coli* tidak dapat mereduksi thiosulfate sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida. Uji indol positif disebabkan bakteri *E. coli* membentuk indol dari tryptopan sebagai sumber karbon. Pada uji indol menunjukkan hasil positif setelah ditambah sebanyak tiga tetes reagen Erlich A dan B. Pada reagen Erlich A dan B mengandung dimetilaminobenzaldehid dan dapat menghasilkan cincin merah pada

permukaan media karena indol akan bereaksi dengan dimetilaminobenzaldehid sehingga membentuk rosindol yang berwarna merah. Uji motilitas diperoleh hasil positif, hal ini ditunjukkan dengan adanya penyebaran pertumbuhan bakteri *E. coli* pada media SIM (Sri 2016).

Media LIA digunakan untuk mengetahui suatu reaksi kimiawi pada metabolisme yang melepaskan gugus amina dari molekul asam amino (deaminasi) dan reaksi kimia yang menyebabkan sebuah gugus karboksil terlepas dari senyawa semula menjadi karbon dioksida (dekarboksilasi) lisin dan sulfida. Pengujian dengan LIA menunjukkan hasil K/KS(-), K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini ditunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) diseluruh media, S(-) artinya uji H₂S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA (Sri 2016).

Media Sitrat digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian sitrat menunjukkan hasil negatif. Hal ini menunjukkan bahwa *E. coli* tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal, dalam media citrat terdapat indikator BTB yang merupakan indikator *pH*, jika mikroba mampu menggunakan sitrat maka asam akan dihilangkan dari media yang berwarna hijau menjadi biru (Sri 2016). Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan hasil bahwa bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *E. coli* ATCC 25922. Hasil uji biokimia dapat dilihat pada lampiran 11.

Berdasarkan dari hasil pengujian identifikasi yang telah dilakukan kemudian dibandingkan dengan pustaka yang digunakan menunjukkan bahwa bakteri uji yang diamati adalah *E. coli* ATCC 25922.

10. Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam biakan murni diambil satu ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi 10 ml media BHI (*Brain Heart Infusion*) secara aseptis yang kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan Mc. Farland 0,5 agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian. Pembuatan suspensi yang telah dilakukan menunjukkan

kekeruhan yang sama dengan *Mc. Farland* 0,5, hal ini dibuktikan dengan cara menempelkan kedua tabung di depan kertas bergaris kemudian diamati kekeruhannya dengan melihat garis pada kertas terlihat atau tidak. Hasil pembuatan suspensi dapat dilihat pada lampiran 12.

11. Pengujian aktivitas antibakteri daun salam secara difusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi yang bertujuan untuk mengetahui daerah hambat pertumbuhan dari bakteri uji. Pengujian antibakteri terhadap *E. coli* ATCC 25922 menggunakan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun salam untuk mengetahui ekstrak atau fraksi yang paling aktif. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah DMSO 5%, dimana pelarut ini merupakan pelarut yang digunakan dalam pembuatan seri konsentrasi pada ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air. Pelarut DMSO 10% merupakan pelarut organik yang tidak bersifat bakterisidal (Reynolds 1996), untuk itu DMSO 5% perlu diikuti sertakan dalam pengujian aktivitas antibakteri.

Hasil dari pengujian DMSO 5% tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga daya hambat yang terbentuk benar-benar merupakan aktifitas dari masing-masing fraksi dan ekstrak dari daun salam. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian difusi adalah 50%, 25% dan 12,5% (Lampiran 13) dengan kontrol positif menggunakan antibiotik kotrimoksazol 25 µg dan kontrol negatif DMSO 5%.

Perhitungan pembuatan konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 21. Kekeruhan suspensi bakteri disesuaikan dengan standard *Mc. Farland*. Metode difusi yang digunakan dalam pengujian ini adalah metode cakram *disk*, sehingga sebelumnya masing-masing cakram ditetesi konsentrasi sebanyak 20 µl. Masa inkubasi pengujian aktivitas bakteri selama 24 jam pada suhu 37°C, daya hambat yang terbentuk berupa zona jernih disekitar daerah cakram *disk* yang dinyatakan dalam ukuran mm.

Pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak daun salam menunjukkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* ATCC 25922. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya zona jernih

yang mengelilingi daerah cakram *disk*. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dapat dilihat pada tabel 9. Foto hasil pengujian dengan metode difusi dapat dilihat pada lampiran 13.

Tabel 9. Hasil uji aktivitas antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi

Sediaan uji	Konsentrasi	Diameter daya hambat			Rata-rata (mm)
		Replikasi			
		1	2	3	
Ekstrak	50%	12	13	11	12,0000
	25%	11	10	11	10,6667
	12,5%	8	9	8	8,3333
Fraksi <i>n</i> -heksan	50%	9	8	8	8,3333
	25%	8	7,5	8	7,8333
	12,5%	7,5	8	7	7,6667
Fraksi etil asetat	50%	15	14	14	14,3333
	25%	13	11	12	12,0000
	12,5%	10	10	11	10,3333
Fraksi air	50%	12	11	11	11,3333
	25%	10	9	11	10,0000
	12,5%	9	8	9	8,6667
Kotrimoksazol	25µg	20,33	20,67	20,67	20,5567
DMSO	5%	0	0	0	,0000

Data di atas menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 70% daun salam konsentrasi 50% memiliki zona hambat yang paling tinggi yaitu 14,33 mm daripada sampel yang lain. Fraksi *n*-heksan dengan konsentrasi 12,5% memiliki zona hambat paling rendah yaitu 7,67 mm. Analisis data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi diuji secara statistik *Analisis of Varian* (ANOVA) *one way*. *One Way* ANOVA digunakan untuk membandingkan fraksi pada tiap konsentrasi. Data yang dianalisis dengan *One Way* ANOVA adalah ekstrak dan fraksi dari daun salam. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol daun salam untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan. Uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov* bertujuan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak, jika data yang diperoleh terdistribusi normal maka akan dilanjutkan uji *One Way* (ANOVA). Hasil uji *One Way* ANOVA pada tabel diameter hambat memiliki perbedaan nyata dalam menghambat *Escherichia coli* ATCC 25922. Tabel uji Tukey terdapat tanda (*) pada *Mean Difference* menunjukkan bahwa perbedaan diameter hambat pada aktivitas antibakteri tersebut signifikan. Tabel

Homogeneous Subsets bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* terdapat 8 subsets, semakin ke kanan arahnya semakin besar diameter daya hambatnya. Diameter daya hambat diketahui dari subsets 1-8 mempunyai perbedaan nyata dalam menghambat aktivitas antibakteri. Fraksi teraktif yang didapat adalah fraksi etil asetat. Subsets 7 menunjukkan fraksi etil asetat konsentrasi 50% memiliki rata-rata daya hambat 14,33 mm dan tidak ada sampel lain yang berada pada subsets yang sama. Sampel yang berada pada subsets 7 dapat dilanjutkan dengan uji dilusi. Hasil statistik dapat dilihat pada lampiran 23.

Hasil pengujian di atas menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi daun salam yang dibuktikan adanya diameter hambat disekitar cakram. Fraksi etil asetat memiliki daya hambat paling besar dibandingkan dengan fraksi *n*-heksan, fraksi air dan ekstrak. Fraksi etil asetat memiliki daya hambat paling besar terhadap *E. coli* ATCC 25922, hal ini dikarenakan etil asetat mampu menarik senyawa paling aktif sebagai antibakteri dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi lainnya. Ekstrak etanol mampu menarik semua senyawa yang terkandung dalam daun salam, akan tetapi senyawa-senyawa tersebut tidak mampu bekerja secara sinergis sehingga daya hambat yang terbentuk lebih kecil dari fraksi teraktif yang mempunyai aktivitas antibakteri yaitu fraksi etil asetat. Fraksi *n*-heksan memiliki aktivitas penghambatan lebih kecil dibandingkan fraksi etil asetat dan fraksi air. Hal ini berkaitan dengan sifat polaritas pelarut yang menarik senyawa aktif dari daun salam yang memiliki aktivitas antibakteri.

Senyawa aktif yang tertarik ke etil asetat yaitu alkaloid dan tanin yang sudah diuji kandungan kimia dari ekstrak dan fraksi teraktif daun salam. Mekanisme kerja dari alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Ajizah 2004). Tanin mempunyai mekanisme kerja sebagai antibakteri dalam menginktivasi adhesin sel mikroba (molekul yang menempel pada sel inang) yang terdapat pada permukaan sel. Tanin memiliki sasaran terhadap polipeptida dinding sel yang

menyebabkan kerusakan pada dinding sel (Sari & Sari 2011). Hasil uji statistik ANOVA yang dilakukan terhadap fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol daun salam menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan.

12. Pengujian antibakteri daun salam secara dilusi

Hasil dari uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dilanjutkan dengan menggunakan metode dilusi. Sediaan yang digunakan dalam metode ini adalah fraksi teraktif dari daun salam dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang diperoleh dari metode difusi. Metode dilusi berguna untuk menentukan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) menggunakan sediaan teraktif yaitu fraksi etil asetat dari daun salam. Seri konsentrasi yang digunakan yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,5625%; 0,7813%; 0,3906%; 0,1959%; 0,0977%; kontrol (+) suspensi bakteri *E. coli* dan kontrol (-) fraksi etil asetat 50%. Hasil perhitungan pembuatan larutan stock secara dilusi dapat dilihat pada lampiran 22. Tabel 10 menunjukkan KHM fraksi etil asetat daun salam terhadap bakteri *E. coli* ATCC 25922.

Tabel 10. Hasil pengujian KHM fraksi etil asetat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode dilusi

Konsentrasi (%)	Hasil inokulasi		
	Fraksi etil asetat		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
Kontrol (-)	-	-	-
50	TT	TT	TT
25	TT	TT	TT
12,50	TT	TT	TT
6,25	TT	TT	TT
3,13	TT	TT	TT
1,56	TT	TT	TT
0,78	TT	TT	TT
0,39	TT	TT	TT
0,19	TT	TT	TT
0,09	TT	TT	TT
Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan:

(-) : Tidak ada pertumbuhan koloni

(+): Ada pertumbuhan koloni

TT: Tidak Terlihat

KHM adalah konsentrasi terendah dari fraksi etil asetat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Parameter KHM dengan metode dilusi cair dapat diketahui dengan melihat kekeruhan (adanya pertumbuhan bakteri) dan kejernihan (tidak adanya pertumbuhan bakteri) pada tabung uji setelah diinkubasi selama 24 jam. Pada penelitian ini kekeruhan tabung uji tidak dapat ditentukan karena fraksi etil asetat berwarna gelap dan pekat (Tabel 10, Lampiran 14). Pengujian KHM tidak dapat diamati sehingga tidak dapat ditentukan nilai KHM, sehingga untuk menentukan nilai KBM masing-masing tabung larutan uji dilakukan penggoresan pada media EA (Endo Agar), kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

KBM dalam penelitian ini dapat diketahui dengan melihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri pada media setelah bakteri hasil uji digoreskan pada media EA. Pembuktian secara goresan pada media selektif EA, hasil positif yang terlihat pada media yaitu adanya pertumbuhan koloni *Escherichia coli* ATCC 25922 yang ditandai dengan adanya koloni berwarna merah metalik karena EA mengandung fuksin dan natrium sulfid. Warna merah pada koloni disebabkan bakteri *Escherichia coli* dan koliform memetabolisme laktosa menjadi aldehid dan asam, sehingga aldehid bereaksi dengan fuksin. Koloni berwarna kilap disebabkan karena *Escherichia coli* bereaksi dengan fuksin kristal sehingga fuksin tersebut diserap. Hasil pengujian aktivitas antibakteri daun salam secara dilusi dapat dilihat pada tabel 11, Lampiran 14.

Tabel 11. Hasil pengujian KBM fraksi etil asetat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode dilusi

Konsentrasi (%)	Hasil inokulasi		
	Fraksi etil asetat		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
Kontrol (-)	-	-	-
50	-	-	-
25	-	-	-
12,50	+	+	+
6,25	+	+	+
3,13	+	+	+
1,56	+	+	+
0,78	+	+	+
0,39	+	+	+
0,19	+	+	+

0,09	+	+	+
Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan:

(-) : tidak ada pertumbuhan koloni

(+) : ada pertumbuhan koloni

Konsentrasi minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya masing-masing dikenal sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Antimikroba tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisidal bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi nilai KHM. KHM ini digunakan oleh laboratorium sebagai alat diagnostik terutama untuk konsistensi resisten, sedangkan pada penelitian digunakan untuk menentukan aktivitas in-vitro antimikroba baru. Nilai KHM berlawanan dengan sensitivitas mikroba yang diuji, dimana semakin rendah nilai KHM dari sebuah antimikroba maka sensitivitas dari bakteri semakin besar. Uji identifikasi dengan cara dilusi bertujuan untuk mengetahui hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antibakteri yang dibutuhkan untuk membunuh bakteri (Jawestz *et al.* 1996).

Replikasi 1, 2 dan 3 dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun salam konsentrasi 50% dan 25% diperoleh hasil tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Hasil KBM yang diperoleh dari fraksi etil asetat yang dapat menghambat bakteri yaitu pada konsentrasi 25% karena adanya senyawa aktif semipolar. Senyawa aktif yang diperoleh dari fraksi etil asetat yaitu alkaloid dan tanin. Mekanisme kerja dari alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Ajizah 2004). Tanin mempunyai mekanisme kerja sebagai antibakteri dalam menginktivasi adhesin sel mikroba (molekul yang menempel pada sel inang) yang terdapat pada permukaan sel. Tanin memiliki sasaran terhadap polipeptida dinding sel yang menyebabkan kerusakan pada dinding sel (Sari & Sari 2011).