

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 1. Determinasi Tanaman Pepaya (*Carica papaya* L)

**1.1. Determinasi tanaman.** Tujuan determinasi tanaman pada penelitian ini yaitu untuk mencocokkan ciri morfologis yang ada pada tanaman dengan menggunakan kunci determinasi, menghindari terjadinya kesalahan dalam pengambilan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman yang lain pada saat pengumpulan bahan. Determinasi tanaman pepaya ini dilakukan di unit Laboratorium Morfologi Sistematika Tumbuhan Universitas Setia Budi Surakarta.

Hasil determinasi tanaman jambu air berdasarkan Steenis: FLORA : 1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9b – 10b – 11b – 12b – 13b – 14a – 15a. golongan 8 - 109b – 119b – 120a – 121b – 124b – 125a – 126a. Familia 85. Caricaceae. *Carica*. 1. *Carica papaya* L.

#### 2. Hasil Pengeringan Biji Pepaya

Biji pepaya dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C. Tujuannya untuk mengurangi kadar air sehingga dapat mencegah tumbuhnya jamur dan bakteri yang menyebabkan pembusukan dan mencegah perubahan kimiawi yang menurunkan mutu serbuk. Hasil yang didapatkan biji pepaya kering secara merata. Bahan yang telah kering mempermudah proses penyerbukan.

#### 3. Hasil Pembuatan Serbuk Biji Pepaya

Biji Pepaya yang telah dikeringkan kemudian dilakukan perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah biji pepaya. Hasil perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah biji pepaya dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah biji pepaya**

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Prosentase (% b/b)
10000	2800	28

Berdasarkan tabel 1 dapat diketahui bahwa biji pepaya dengan bobot basah 10000 gram dikeringkan dan diperoleh bobot kering yaitu 2800 gram. Prosentase bobot kering terhadap bobot basah sebesar 28%. Perhitungan prosentase bobot basah terhadap bobot kering dapat dilihat pada lampiran 11 .

Serbuk biji pepaya yang telah kering kemudian diserbuk dengan cara diblender kemudian diayak dengan menggunakan ayakan nomor 40 mesh. Tujuan penyerbukan untuk memperluas partikel bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung secara efektif.

#### 4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk biji pepaya

Serbuk biji pepaya yang sudah kering diukur susut pengeringannya dengan menggunakan alat *Moisture balance*. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk biji pepaya dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk biji pepaya**

Bobot awal (gram)	Kadar air % ( $\%_b$ )
2,00	7,00
2,00	9,00
2,00	5,00
Rata – rata	7,00

Prosentase rata – rata serbuk biji pepaya yang diukur dengan alat *Moisture balance* yaitu 7,00 %. Susut pengeringan yang terlalu tinggi dapat mengaktifkan enzim – enzim dalam simplisia yang dapat berakibat rusak atau berubahnya komposisi kimia pada simplisia tersebut sehingga menurunkan kualitas serbuk tersebut dan mudah ditumbuhi bakteri.

#### 5. Hasil pembuatan ekstrak etanol 70% biji pepaya

Serbuk biji pepaya sebanyak 700 gram yang diperoleh dari proses penyerbukan dimasukkan dalam maserator, ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 1 : 7,5 sebanyak 5,250 L, maserasi dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojog, kemudian disaring dengan kain flanel sehingga diperoleh maserat I. Ampas dari sisa maserat I diremaserasi dengan etanol 70%, perbandingan 1 : 2,5 sebanyak 1,750 L selama 1 hari dengan sesekali digojog. Ampas dari hasil remaserasi disaring dengan kain flanel sehingga diperoleh maserat II. Maserat I dan II dicampur, diuapkan dengan evaporator sampai

terbentuk ekstrak kental. Hasil pembuatan ekstrak kental maserasi biji pepaya dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak etanol 70% biji pepaya**

Bahan sampel (g)	Bobot ekstrak (g)	Prosentase (% b/b)
700	120	17,14

Berdasarkan tabel 3 dapat diketahui bahwa prosentase rendemen ekstrak etanol 70% biji pepaya yang diperoleh sebanyak 17,14 %. Hasil perhitungan prosentase ekstrak etanol 70% biji pepaya dapat dilihat pada lampiran 12 .

## 6. Hasil uji bebas etanol ekstrak biji pepaya

Ekstrak biji pepaya dilakukan uji bebas etanol dengan melakukan esterifikasi alkohol. Hasil uji bebas etanol ekstrak biji pepaya dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Hasil uji bebas etanol ekstrak biji pepaya**

Uji bebas etanol	pustaka (Praeparandi 1978)	Hasil uji
Ekstrak biji pepaya +H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc+CH <sub>3</sub> COOH, dipanaskan	tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol	tidak tercium bau ester yang khas dari etanol

Berdasarkan tabel 4 dapat diketahui bahwa uji ekstrak biji pepaya sudah bebas dari pelarutnya yaitu etanol 70% yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

## 7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pepaya

Identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pepaya yaitu triterpenoid, alkaloid, flavonoid dan saponin yang dilakukan dengan buku Depkes RI (1979) dan dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Setia Budi. Identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pepaya dapat dilihat pada tabel 5.

**Tabel 5. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pepaya**

kandungan kimia	Test	Pustaka (Depkes RI 1979)	Hasil	Ket
<b>Terpenoid</b>	Ekstrak + asetat anhidrida kemudian + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (panaskan dinginkan)	Terbentuknya warnna merah mudah	Terbentuk warna merah muda	+
<b>Flavonoid</b>	Ekstrak + air + serbuk Mg + larutan HCl (1:1) dan pelarut amil alkohol,kocok	Terbentuk warna merah atau kuning,atau jingga pada amil alkohol.	Terbentuk jingga pada amil alkohol	+

<b>Alkaloid</b>	kuat	Terbentuk endapan	Tidak terbentuk +
	Serbuk + HCl + larutan mayer	menggumpal berwarna putih atau kuning. Terbentuk endapan berwarna coklat-hitam.	endapan putih menggumpal berwarna putih atau kuning.
	Serbuk + HCl + dragendrof		Terdapat endapan berwarna coklat-hitam.
<b>Saponin</b>	Ekstrak + air panas	Terbentuk buih tidak kurang dari 10 menit	Terbentuk buih + tidak kurang dari 10 menit

Berdasarkan hasil pada tabel 5 dapat dilihat bahwa hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pepaya yaitu triterpenoid, alkaloid, flavonoid dan saponin yang telah dilakukan di Laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Setia Budi menunjukkan hasil positif untuk identifikasi triterpenoid, alkaloid, flavonoid dan saponin dibuktikan dengan buku Depkes RI (1979). Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak biji pepaya dapat dilihat pada lampiran 6.

## 8. Fraksinasi

Hasil ekstraksi yang telah dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, kemudian ditimbang sebanyak 10 gram untuk dilakukan fraksinasi. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar dan senyawa semi polar akan masuk ke pelarut semi polar (Harborne 1987).

**8.1 Hasil fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan air.** Hasil sediaan ekstrak maserasi yang ada ditimbang, kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut nonpolar (*n*-heksan), difraksinasi 3 kali dengan pelarut *n*-heksana masing-masing 75 mL, kemudian fraksi *n*-heksana yang didapat diuapkan. Residu yang didapat dilakukan ekstraksi lanjutan dengan pelarut etil asetat. Rendemen hasil fraksi *n*-heksana dapat dilihat di tabel 6.

**Tabel 6. Rendemen hasil fraksinasi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan air**

Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)			Prosentase % ( <sup>b</sup> / <sub>b</sub> )		
	<i>n</i> -heksan	etil asetat	air	<i>n</i> -heksan	etil asetat	air
10,096	0,734	2,396	3,586	7,27	23,73	35,51
10,187	0,731	2,385	3,583	7,17	23,41	35,17
10,175	0,732	2,392	3,583	7,19	23,50	35,22
Rata – rata	2,197	7,173	10,752	7,21	23,54	35,3

Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat bahwa perhitungan prosentase rendemen fraksinasi fraksi *n*-heksan biji pepaya didapat prosentase rata-rata yaitu 7,21 %. Hasil perhitungan rendemen fraksi *n*-heksan biji pepaya dapat dilihat pada lampiran 13.

Residu dari hasil fraksi *n*-heksana difraksinasi 3 kali dengan pelarut etil asetat (pelarut semi polar) masing-masing sebanyak 75 mL, kemudian fraksi etil asetat yang didapat diuapkan. Residu yang didapat dilakukan pemekatan. Prosentase rendemen fraksi etil asetat biji pepaya yang didapat yaitu 23,54%. Hasil perhitungan rendemen fraksi etil asetat biji pepaya dapat dilihat pada lampiran 14.

Residu dari ekstrak etil asetat dilanjutkan dengan pemekatan sehingga didapat fraksi air. Prosentase rendemen fraksi air biji pepaya yang didapat yaitu 35,3%. Hasil perhitungan rendemen fraksi air biji pepaya dapat dilihat pada lampiran 15. Hasil fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibandingkan fraksi yang lain. Rendemen setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol biji pepaya berbeda.

## **9. Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli***

**9.1 Hasil identifikasi makroskopis.** Identifikasi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, biakan *Escherichia coli* digosok pada media selektif *Endo Agar* (EA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ada penampakan koloni merah dengan kilat logam yang disebabkan karena adanya fermentasi laktosa dan warna medium merah violet. Hasil identifikasi bakteri *Escherichia coli* secara inokulasi dapat dilihat pada gambar 12, Lampiran 7.

**9.2 Hasil identifikasi mikroskopis.** Pewarnaan Gram untuk memastikan bahwa bakteri tersebut golongan Gram negatif. Hasil identifikasi mikroskopis menunjukkan bahwa sel bakteri berwarna merah, bentuk bacilli. Penetasan Kristal violet (Gram A) menyebabkan Kristal ungu akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri Gram positif dan negatif. Penetasan mordant (*lugol, s iodine*/Gram B)

menyebabkan adanya ikatan CV dengan iodine yang akan meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri. Pada Gram positif dapat terbentuk CV iodine-ribonukleat pada dinding sel. Penetesan Gram C (alkohol 96%) menyebabkan pori – pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks *CV-iodine* tidak menempel di dinding sel, menyebabkan sel Gram negatif menjadi bening. Penetesan *safranin* (Gram D), safranin akan mewarnai sel Gram negatif menjadi berwarna merah (Volk dan Wheller 1988). Identifikasi mikroskopis dapat di lihat dalam lampiran 7.

**9.3 Hasil identifikasi uji biokimia.** Identifikasi uji biokimia pada *Escherichia coli* berdasarkan tabel 9 dan hasil identifikasi dapat dilihat dalam lampiran 7.

**Tabel 7. Hasil identifikasi biokimia *Escherichia coli***

Pengujian	Hasil	Pustaka (Volk dan Wheller 1988)
KIA	A/AGS(-)	A/AGS(-)
SIM	+++	+++
LIA	K/KS(-)	K/KS(-)
Citrat	-	-

Hasil pengujian pada medium Kligler's Iron Agar (KIA) untuk mengetahui terjadinya fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas, dan pembentukan sulfida. Pengujian dengan medium KIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup> C menunjukkan hasil A/AGS (-), A/A artinya pada lereng dan dasar media berwarna kuning, hal ini menunjukkan bahwa bakteri memfermentasi glukosa dan laktosa, G artinya terbentuk gas serta terbentuknya warna hitam pada media, S (-) artinya H<sub>2</sub>S negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna hitam pada media. Bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H<sub>2</sub>S, dan H<sub>2</sub>S akan bereaksi dengan Fe<sup>++</sup> yang terdapat pada media sehingga tidak terbentuk warna hitam. Medium KIA mengandung laktosa dan glukosa dalam konsentrasi 1% laktosa, 0,1% glukosa, dan phenol red sebagai indicator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam suasana asam. Medium KIA juga mengandung sodium thiosulfat yaitu susunan untuk penghasil H<sub>2</sub>S.

Hasil pengujian pada medium Sulfida Indol Motilitas (SIM) untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Pengujian dengan media Sulfida Indol Motilitas (SIM) setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C menunjukkan hasil positif bakteri *Escherichia coli* yang ditunjukkan dengan sulfida negatif, indol positif, dan motilitas positif ( -++ ) . Sulfida Indol Motilitas (SIM) artinya pada uji sulfida bakteri *Escherichia coli* tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide sehingga media tidak berwarna hitam. Uji indol dengan menambahkan tiga tetes Erlich A dan B, permukaan media berwarna merah muda ini berarti uji indol positif, bakteri *Escherichia coli* membentuk indol. Casein pepton mengandung banyak triptofan, yang diurai oleh bakteri *Escherichia coli*. Sehingga bakteri menghasilkan enzim triptophanase di medium menjadi asam piruvat + NH<sub>3</sub> dan menghasilkan indol. Uji motilitas positif ditunjukkan dengan penyebaran di media Sulfide Indol Motilitas (SIM).

Medium Lysin Iron Agar (LIA) untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Pengujian dengan LIA setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup> C menunjukkan hasil K/KS(-). K/K artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin tetapi mendeakarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) di seluruh media. S(-) artinya uji H<sub>2</sub>S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA (Volk dan Wheller 1988). Hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan bahwa bakteri uji yang digunakan dalam penelitian adalah *Escherichia coli*.

Pengujian pada medium CITRAT untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Hasil pengujian dengan medium CITRAT setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup> C menunjukkan hasil negatif sehingga warna media tetap hijau. Hasil menunjukkan bahwa *Escherichia coli* tidak menggunakan CITRAT sebagai sumber karbon tunggal. Medium CITRAT terdapat indikator BTB (Bromo thymol blue) yang merupakan indikator pH, jika mikroba mampu menggunakan CITRAT

menyebabkan suasana basa, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru.

## 10. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

**10.1 Metode difusi.** Hasil dari fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari biji pepaya serta pembanding sediaan kotrimoxsazol dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi menggunakan metode difusi untuk mendapat Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari fraksi yang paling aktif. Medium yang digunakan adalah *Natrium Agar* (NA). Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar disk menandakan bahwa kandungan ekstrak biji pepaya memiliki daya hambat terhadap bakteri uji. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian ini yaitu 10%, 5%, 1%. Kontrol positif yang digunakan yaitu kotrimoxsazol dan DMSO 1% sebagai kontrol negatif. Perhitungan konsentrasi larutan dapat dilihat pada lampiran. Hasil uji antibakteri secara difusi dapat dilihat pada lampiran 9.

**Tabel 7. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air secara difusi terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922**

Bahan uji	Konsentrasi	Daya hambat			Rata-rata $\pm$ SD	
		I	II	III		
Ekstrak	10%	8	8	7	7,6	$\pm$ 0,6
	5%	6	5	6	5,6	$\pm$ 0,6
	1%	4	4	4	4	$\pm$ 0
<i>n</i> -Heksana	10%	3	3	3	3	$\pm$ 0
	5%	2	2	2	2	$\pm$ 0
	1%	1	1	1	1	$\pm$ 0
Etil asetat	10%	20	25	26	23,6	$\pm$ 3,2
	5%	19	16	18	17,6	$\pm$ 1,5
	1%	10	10	11	10,3	$\pm$ 0,5
Air	10%	10	10	10	10	$\pm$ 0
	5%	9	9	8	8,6	$\pm$ 0,6
	1%	6	7	6	6,3	$\pm$ 0,6
DMSO	1%	0	0	0	0	$\pm$ 0
		0	0	0	0	$\pm$ 0
		0	0	0	0	$\pm$ 0
Kotrimoxsazol	1%	10	9	10	9,6	$\pm$ 0,6
		10	10	10	10	$\pm$ 0
		10	10	9	9,6	$\pm$ 0,6

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji pepaya, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* menunjukkan adanya daya hambat. Hal ini dapat dibuktikan dengan adanya daerah jernih

disekitar disk. Diameter hambat rata-rata yang paling besar adalah fraksi etil asetat pada konsentrasi 10%. Uji selanjutnya adalah uji analisis data, tujuannya untuk memastikan bahwa etil asetat benar aktif dalam menghambat bakteri *Escherichia coli*.

Analisis data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi menggunakan SPSS yaitu *Kolmogorove-Sminov*. Hasil uji *One-Sample Kolmogorove-Sminov* diperoleh signifikansi  $0,111 > 0,05$  maka  $H_0$  diterima, data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji ANOVA *two way*. Hasil signifikasi dari data uji ANOVA *two way* adalah  $0,000 < 0,05$  yang artinya keempat sampel ada perbedaan dalam diameter zona hambat.

Uji ANOVA *two way* digunakan untuk membandingkan perbedaan rata-rata antara konsentrasi. Data yang dianalisis dengan ANOVA *two way* adalah konsentrasi 10%; 5%; dan 1% dari ekstrak etanol biji pepaya, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air. Kontrol positif dan kontrol negatif diikut sertakan dalam analisis ANOVA *two way*. Data yang dihasilkan bertujuan untuk membandingkan hubungan antara ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, air, kontrol positif, dan kontrol negatif guna mendapatkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa fraksi etil asetat 10% terbukti paling aktif terhadap aktivitas antibakteri, karena mempunyai daya hambat yang paling besar diantara ekstrak dan fraksi lain. Meskipun demikian fraksi etil asetat 10% tidak ada beda signifikan dengan fraksi etil asetat 5%, karena berada dalam subset yang sama sehingga dapat dikatakan bahwa fraksi etil asetat 10% merupakan fraksi teraktif tetapi fraksi etil asetat 5% lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Pada penelitian ini dosis Kotrimoxazol yang digunakan adalah 25mg/disk masih tidak sebanding fraksi etil asetat dari biji pepaya.

Sifat etil asetat yang semi polar ini menyebabkan fraksi mengandung metabolit sekunder yang lebih kompleks dibandingkan pada fraksi polar dan nonpolar. Fraksi etil asetat lebih banyak menarik senyawa yang diduga sebagai antibakteri yaitu flavonoid. Hal tersebut mengakibatkan fraksi etil asetat menjadi

fraksi teraktif dengan membentuk daya hambat paling besar serta teraktif dibandingkan dengan ekstrak, fraksi *n*-heksana, dan fraksi air (Sreelatha *et al.* 2013).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri karena kemampuannya dalam membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan dinding sel bakteri. Mekanisme kerjanya dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Prayudhani *et al.* 2012).

**10.2 Metode dilusi.** Hasil dari uji difusi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari biji pepaya yang telah dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat yang paling aktif dalam menghambat dengan diameter hambat 10%. Selanjutnya, dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat biji pepaya dengan metode dilusi untuk melihat Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat biji pepaya dengan metode dilusi dapat dilihat pada tabel 11

**Table 8. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat biji pepaya secara dilusi terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922**

Konsentrasi fraksi etil asetat (%)	Replikasi		
	I	II	III
Kontrol (-)	-	-	-
10	-	-	-
5	-	-	-
2,5	-	-	-
1,25	-	-	-
0,625	+	+	+
0,312	+	+	+
0,156	+	+	+
0,078	+	+	+
0,039	+	+	+
0,019	+	+	+
Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan : (+) : ada pertumbuhan bakteri  
 (-) : tidak ada pertumbuhan bakteri  
 Kontrol (-) : Fraksi etil asetat  
 Kontrol (+) : Suspensi bakteri + media BHI

Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan menginokulasikan sediaan dari tabung uji pada medium selektif *Endo Agar* (EA) dalam cawan petri. Konsentrasi Bunuh

Minimum (KBM) ditentukan pada medium *Endo Agar* dengan konsentrasi minimum yang tidak menunjukkan pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25992.

Konsentrasi fraksi yang digunakan yaitu 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,312%; 0,156%; 0,078%; 0,039%; 0,019%. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat ditentukan dari kadar terendah larutan uji yang terlihat jernih yaitu 10% dan perlu dilakukan inokulasi dalam medium selektif pada masing-masing tabung untuk mengetahui konsentrasi bunuh minimum (KBM). Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dari tabel 9 dapat diketahui bahwa fraksi etil asetat memiliki konsentrasi bunuh minimum sebesar 1,25%.