

## UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI N-HEKSAN, FRAKSI ETIL ASETAT, FRAKSI AIR DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum*) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

<sup>1</sup>Dinar Aditama Nugroho\*, <sup>2</sup>Tatiana Siska W M.Farm, <sup>3</sup>apt. Anita Dwi S M.Farm

<sup>1</sup>Universitas Duta Bangsa Surakarta, dinaraditama16@gmail.com <sup>2</sup>Universitas Duta Bangsa Surakarta, siskatatiana@gmail.com <sup>3</sup>Universitas Duta Bangsa Surakarta, anitadwi098@gmail.com

### ABSTRAK

Daun salam (*Syzygium polyanthum*) merupakan bahan tambahan dalam bumbu dapur yang memiliki efek pengobatan untuk kesehatan tubuh dalam mencegah beberapa penyakit. Sejauh ini, banyak penelitian yang telah mengungkap bermacam-macam khasiat daun salam, diantaranya untuk pengobatan dalam menurunkan kadar gula darah, menurunkan tekanan darah, menurunkan kadar kolesterol darah, menurunkan kadar asam urat, mengobati sakit maag (gastritis), gatal-gatal (pruritis), kudis (scabies) dan eksim. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan daya hambat ekstrak dan fraksi N-Heksan, fraksi Etil Asetat, fraksi Air Daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 serta untuk mengetahui fraksi teraktif untuk menghambat bakteri. Pengujian ekstrak dan fraksi dilakukan dengan menggunakan metode difusi dan dilusi pada sampel ekstrak yang dimaserasi dengan etanol 96% kemudian dilanjutkan proses fraksinasi. Pengujian dengan metode difusi menggunakan konsentrasi 1%, 5%, 10%, 15%, 20% menggunakan kontrol positif Ciprofloxacin 0.5% dan metode dilusi konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,195% dan 0,098%. Hasil pengujian aktifitas antibakteri menunjukkan ekstrak, fraksi N-Heksan, Etil Asetat, dan Air memiliki daya hambat terhadap bakteri. Fraksi teraktif pada penelitian ini adalah fraksi Etil Asetat dengan daya hambat fraksi etil asetat pada konsentrasi 20% dengan rata-rata zona hambat sebesar 13,33 mm. Hasil uji dilusi Fraksi Etil Asetat dengan KBM dan KHM pada konsentrasi 25%.

**Kata Kunci :** ekstrak dan fraksi, fraksi etil asetat, fraksi air daun salam (*Syzygium polyanthum*), *staphylococcus aureus* ATCC 25923, difusi, dilusi

### ABSTRACT

Salam leaf (*Syzygium polyanthum*) is an additional ingredient in kitchen spices that has a medicinal effect for the health of the body in preventing several diseases. So far, many studies have revealed the various benefits of salam leaves, including for treatment in lowering blood sugar levels, lowering blood pressure, lowering blood cholesterol levels, lowering uric acid levels, treating stomach ulcers (gastritis), itching (pruritis), scabies (scabies) and eczema. This study aims to determine the inhibitory ability of extracts and fractions of N-Hexane, Ethyl Acetate fraction, Salam Leaf Water fraction (*Syzygium polyanthum*) against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and to determine the most active fraction to inhibit bacteria. Testing of extracts and fractions was carried out using the diffusion and dilution method on the extract samples macerated with 96% ethanol and then continued with the fractionation process. Tests using the diffusion method using a concentration of 1%, 5%, 10%, 15%, 20% using a positive control Ciprofloxacin 0.5% and the dilution method with concentrations of 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.195% and 0.098%. The results of the antibacterial activity test showed that the extract, N-Hexane, Ethyl Acetate, and Water fractions had inhibitory power against bacteria. The most active fraction in this study was the ethyl acetate fraction with the inhibitory power of the ethyl acetate fraction at a concentration of 20% with an average inhibition zone of 13.33 mm. The results of the dilution test of the Ethyl Acetate Fraction with KBM and KHM at a concentration of 25%.

**Keyword :** extract and fraction, ethyl acetate fraction, water fraction of salam leaf (*Syzygium polyanthum*), *staphylococcus aureus* ATCC 25923, diffusion, dilution

## PENDAHULUAN

Sejak lama obat tradisional dikenal diseluruh dunia termasuk Indonesia yang memiliki tumbuhan yang beraneka ragam. Masyarakat Indonesia telah lama menggunakan obat tradisional berupa tanaman atau bahan alam. Obat tradisional banyak diminati untuk menjaga kesehatan dan mencegah penyakit karena memiliki beberapa keunggulan dibandingkan obat sintetik. Obat tradisional banyak menggunakan bahan dari tumbuhan yang kemudian diramu secara tradisional dan penggunaan serta pemanfaatannya diperoleh berdasarkan pengalaman.

Infeksi disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, virus, jamur dan protozoa (Mulyati, 2009: 1). Berbagai obat anti-infeksi seperti antibiotik merupakan salah satu kelompok yang banyak dipilih. Timbulnya resistensi telah menyebabkan salah satu kelompok antibiotik tertentu tidak lagi digunakan dalam terapi, disisi lain harga antibiotik yang mahal menyebabkan masyarakat kalangan ekonomi lemah tidak mampu membelinya, sehingga penggunaan berbagai tumbuhan dalam pengobatan penyakit infeksi dapat menjadi pilihan bagi masyarakat Indonesia (Wibowo dkk, 2008: 3).

Senyawa utama yang terkandung di dalam daun salam adalah flavonoid. Flavonoid adalah senyawa polifenol yang memiliki manfaat sebagai antivirus, antimikroba, antialergik, antiplatelet, antiinflamasi, antitumor, dan antioksidan sebagai sistem pertahanan tubuh (Harismah dan Chusniatun, 2016).

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat, umumnya tumbuh berpasangan dan berkelompok seperti anggur, tidak menghasilkan spora dan tidak motil (Habib dkk, 2015). Bakteri *S. aureus* tahan terhadap pengeringan dan dapat mentoleransi garam dengan konsentrasi tinggi (NaCl 10%) bila ditanam pada media buatan. Pada manusia bakteri ini merupakan flora normal, namun tetap menjadi patogen yang potensial (Madigan *et al*, 2012).

## METODE

### ALAT

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi, peralatan listrik berupa *water bath*, *rotary evaporator*, blender, autoklaf, inkubator, oven dan LAF (*Laminar Air Flow*) kompor, timbangan analitik,. Peralatan kaca berupa corong pisah, toples kaca, cawan petri, tabung reaksi, botol pengencer, erlenmeyer dan labu ukur. Peralatan non kaca berupa spuit injeksi, ose bulat, pinset dan sendok tanduk, gelas ukur, gelas, *moisture balance*, batang pengaduk, kertas saring, lemari pendingin, gelas beker, pipet, pH meter universal, aluminium foil, jangka sorong, inkubator, sentrifugasi, ayakan, lampu spiritus.

### BAHAN

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah serbuk daun salam (*Syzygium polyanthum*), etanol 96%, bakteri *Staphylococcus aureus*, FeCl<sub>3</sub>, Logam Na dan HCL, Etil Asetat, Air, *N*-Heksan, Media *Mueller Hinton*, media Na, Media NB, DMSO 1%, ciprofloxacin (Novell).

### PROSEDUR

#### 1. Pengambilan bahan

Daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang diambil dari pekarangan Desa Sanggir Paulan Colomadu. Dilakukan penyortiran daun salam yang utuh, masih berwarna hijau tua dan tampak segar, dipisahkan dari tangkainya, kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih, kemudian dikering anginkan karena dilihat dari zat aktif berupa flavonoid yang akan rusak terhadap suhu tinggi.

#### 2. Determinasi

Identifikasi tanaman yang pertama kali dilakukan adalah determinasi tanaman, dimana determinasi tanaman pada tahap ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun salam (*Syzygium*

polyanthum) dengan mencocokkan ciri dan morfologi tanaman yang akan diteliti dengan kunci determinasi untuk menghindari kesalahan dari tanaman yang digunakan untuk penelitian. Determinasi daun salam (*Syzygium polyanthum*) ini dilakukan di B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

3. Pembuatan serbuk

Daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang sudah kering kemudian digiling lalu diayak dengan ayakan no.40 mesh dan disimpan dalam wadah yang kering kemudian ditutup rapat

4. Pemeriksaan karakteristik serbuk

Susut pengeringan. Penetapan susut pengeringan menggunakan metode gravimetri menggunakan alat *Moisture Balance* dengan replikasi 3x. Timbang 2 gram serbuk daun salam, kemudian masukkan ke dalam alat *Moisture Balance*. Pengoperasian alat telah selesai apabila alat tersebut berbunyi dengan ditandai bunyi tertentu, kemudian catat hasil susut pengeringan (dalam satuan %) (Kusuma & Andriani 2019).

5. Maserasi

Serbuk sebanyak 200 gram dimasukkan ke dalam botol maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 2000 ml, direndam selama 5 hari dengan perbandingan 1:10 kemudian digojok 3 kali sehari. Hasil maserasi disaring dengan menggunakan kain flannel steril setelah itu ampas dipisahkan dengan filtrat, kemudian ekstrak yang didapatkan dipisahkan dengan penyaringnya, yakni larutan etanol 96% dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut. ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) sampai didapatkan ekstrak yang kental.

6. Standarisasi ekstrak daun salam

Uji bebas etanol. Pengujian bebas etanol dilakukan dengan cara dimasukkan sampel ke dalam tabung reaksi, tambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Hasil uji negatif apabila tidak tercium bau ester (Praepandi, 2006).

7. Identifikasi kandungan kimia

Uji Flavonoid. Sampel ekstrak ditambah dengan logam Mg dan HCl akan terbentuk garam flavilium berwarna merah atau jingga (Fisca *et al*, 2018).

Uji Tanin. Sampel ekstrak ditambah dengan beberapa tetes  $FeCl_3$  dan perubahan warnamembentuk warna hijau (Fisca *et al*, 2018).

Uji Saponin. Sampel ekstrak ditambah dengan aquades panas akan terbentuk busa atau buih selama 15 menit, timbulnya busa akan menunjukkan adanya saponin (Fisca *et al*, 2018).

8. Fraksinasi

Fraksinasi *n*-heksan ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*). Dibuat dengan cara ekstrak etanol daun salam dilarutkan dengan 75 ml air kemudian difraksinasi dengan pelarut non polar *n*-heksan sebanyak 75 ml dalam corong pisah. Filtrat yang dibagian atas fraksi *n*-heksan dipisahkan dari filtrat yang di bagian bawah air, sehingga didapat fraksi *n*-heksan (replikasi 3x).

Fraksinasi etil asetat ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*). Dibuat dengan cara fraksinasi dari residu *n*-heksan difraksi kembali dengan menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 75 ml sebagai pelarut semi polar dalam corong pisah. Fraksi yang dibagian atas fraksi etil asetat (replikasi 3x).

Fraksinasi air ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*). Dibuat dengan cara hasil fraksinasi dari residu etil asetat, kemudian didapatkan fraksi air.

9. Identifikasi Kandungan Kimia secara KLT

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat pada daun salam. Fraksi yang paling aktif diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi yang dinyatakan paling aktif ditotolkan menggunakan pipa kapiler di atas lempeng kromatografi kemudian dielusikan dengan jarak pengembang 5 cm. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) mula-mula dilakukan dengan cara menaikkan cairan pengembang (fase gerak)

didalam suatu bejana (chamber) yang dindingnya telah dilapisi dengan kertas saring. Hal ini menyebabkan atmosfer di dalam bejana dijenuhi dengan fase gerak kemudian dilakukan elusi sampai fase gerak mencapai batas elusi. Pengembangan yang sudah dilakukan dilanjutkan dengan pengeringan lempeng kromatografi lapis tipis, kemudian dilakukan deteksi di bawah sinar UV dan pereaksi lainnya. Bercak yang dideteksi ditentukan harga Rf dan penampakan warnanya. Fase diam menggunakan lempeng KLT, lempeng yang digunakan adalah lempeng silika gel GF254 dengan ukuran  $10 \times 10$  cm.

Identifikasi Senyawa Flavonoid. Fase gerak asam asetat glacial : butanol : air (1:4:5), dengan penampak noda uap ammonia. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna kuning coklat setelah diuapi ammonia pada pengamatan dengan sinar tampak dan berwarna biru pada UV 366 nm menegaskan adanya kandungan flavonoid (Marliana, 2005).

Identifikasi Senyawa Tanin. Fase gerak metanol-air (6:4), dengan penampak noda Pereaksi FeCl<sub>3</sub> 5 %. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna hitam (Banu dan Nagarajan, 2014).

Identifikasi Senyawa Saponin. Identifikasi senyawa saponin menggunakan fase gerak kloroform : methanol : akuades ( 13:7:2), fase gerak yang digunakan adalah silika gel GF254. Dideteksi di bawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm (Pratama *et al.*,2012).

#### 10. Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh alat dan bahan (media tanam) yang akan digunakan dicuci bersih kemudian dikeringkan. Alat-alat gelas seperti gelas ukur, labu ukur dimasukkan kedalam plastik tahan panas dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Bahan-bahan yang terbuat dari karet disterilkan dengan merendam dengan alkohol 70%, kemudian jarum ose disterilkan dengan dipijarkan menggunakan Bunsen atau lampu spiritus. Alat-alat kaca non presisi seperti tabung reaksi, gelas beker, erlenmeyer ditutup mulutnya dengan kapas. Cawan petri dibungkus dengan kertas, kemudian seluruh alat dimasukkan kedalam plastik tahan panas dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Pertiwi 2010).

#### 11. Pembuatan Media NA

Media NA sebanyak 0,46 gram dilarutkan dalam 20 ml aquadest (23 g/1000 ml) menggunakan erlenmeyer. Selanjutnya dihomogenkan dengan *magnetic stirrer hot plate*. Sebanyak 5 ml dituangkan masing-masing pada 3 tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil. Media disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama  $\pm 30$  menit sampai media memadat pada kemiringan 30°. Media agar miring digunakan untuk inokulum suspensi bakteri uji.

#### 12. Peremajaan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Peremajaan bakteri menggunakan agar miring NA dengan mengambil satu ose bakteri menggunakan ose steril yang sudah dipanaskan dengan cara pemijaran kemudian ditusuk dan digoreskan pada permukaan agar miring dengan cara zig-zag dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

#### 13. Penyiapan bakteri uji

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Staphylococcus aureus*. Bakteri yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta yang diremajakan dalam medium Nutrien Agar (NA) miring dan diinkubasi selama 1x 24 jam pada suhu 37°C.

#### 14. Pembuatan suspense bakteri

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Staphylococcus aureus*. Bakteri yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta yang diremajakan dalam medium Nutrien Agar (NA) miring dan diinkubasi selama 1x 24 jam pada suhu 37°C.

#### 15. Uji biokimia bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

a. Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan gram. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian tetes Kristal Violet (Gram

A) sebagai pewarna utama pada kedua preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian tetesi mordant (*Iugols iodine*/Gram B), didiamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C (alkohol) dan diamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian keringkan preparat dengan kertas tissue yang ditempelkan di sisi ulasan lalu didiamkan sampai mengering di udara. Tujuan dari pewarnaan Gram adalah untuk memastikan bakteri tersebut termasuk dalam golongan bakteri Gram negatif atau bakteri Gram positif. Gram negatif didapatkan bila sel bakteri tersebut berwarna merah, bentuk bulat berarti positif termasuk dalam golongan *Staphylococcus aureus* (Dyah, 2019).

b. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan uji biokimia

1. Tes Koagulasi. Uji koagulase dilakukan dengan cara setetes NaCl fisiologis steril diletakkan pada kaca benda, kemudian menambahkan satu Ose biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Setetes plasma ditambahkan kemudian keduanya dicampur menggunakan Ose. Reaksi positif terjadi apabila dalam 2-3 menit terjadi gumpalan/presipitat granuler (Dewi, 2013).
2. Tes Katalase. Uji katalase dilakukan dengan bakteri uji ditambahkan 2-3 tetes hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% pada kaca benda, lalu mengamati terbentuknya gelembung-gelembung udara (Jawetz et al. 2008).

16. Pembuatan Media MHA

Sebanyak 11,4 gram Media *Mueller Hinton* agar dilarutkan dalam 300 ml aquadest dipanaskan sampai larut. Media disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Dinginkan sampai suhu  $\pm 50^\circ\text{C}$ , selanjutnya dibagi ke dalam 12 cawan petri steril. Setelah dingin, medium padat disimpan dalam kulkas.

17. Pembuatan Medium Nutrient broth (NB)

Sebanyak 8 gram bubuk NB dilarutkan dengan 1 liter akuades dalam erlenmeyer kemudian diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah itu medium NB disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

18. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi

a. **Metode difusi.** Ekstrak dan fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun salam yang diperoleh diuji secara difusi ke bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Metode yang digunakan yaitu difusi dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat kemudian diinokulasikan ke dalam media MHA dengan metode perataan (*Spread Plate Method*). Medium didiamkan 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Kertas cakram direndam selama 15 menit dengan ekstrak etanol daun salam dan fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dengan 5 seri konsentrasi yaitu 1%, 5%, 10%, 15% dan 20%, ciprofloxacin 0,5% sebagai kontrol positif dan kontrol negatif pelarut DMSO 1% dan kontrol normal tanpa penambahan suspensi bakteri dan ciprofloxacin, masing-masing dengan volume 10 $\mu\text{l}$ . Masa inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya. Diameter zona hambat sekitar kertas cakram diukur dan dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri sekitar cakram menandakan bahwa kandungan kimia daun salam memiliki daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

b. **Metode dilusi.** Metode tersebut menggunakan 13 tabung steril. Konsentrasi larutan stok yang dibuat adalah 50%, kemudian diencerkan dengan pelarut DMSO 1%. Secara aseptik darilarutan stok tersebut dibuat deret konsentrasi dibawahnya yaitu kontrol (-); 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,095%; dan kontrol (+) ciprofloxacin 0,05%. Tabung pertama berisi kontrol normal, tabung kedua berisi kontrol negatif DMSO 1%, tabung ketiga berisi larutan stok 50%, tabung keempat berisi larutan stok 25%, tabung

kelima berisilarutan stok 12,5%, tabung keenam berisi larutan stok 6,25%, tabung ketujuh berisi larutan stok 3,12%, tabung kedelapan berisi larutan stok 1,56%, tabung kesembilan berisi larutan stok 0,78%, tabung kesepuluh berisi larutan stok 0,39%, tabung kesebelas berisi larutan stok 0,19%, tabung kedua belas berisi larutan stok 0,095% dan tabung ketiga belas berisi kontrol positif (ciprofloxacin). Media NB (*Nutrient broth*) yang digunakan dimasukkan 0,5 mL pada tiap tabung kecuali tabung 2 (kontrol negatif). Secara aseptik, masukkan 1 mL larutan stok yang akan diuji, kemudian dari tabung 3 dimasukkan 0,5 mL larutan stok, kemudian dari tabung 4 dipipet 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung 5 begitu seterusnya sampai tabung 12 kemudian dibuang. Tambahkan 0,5 mL biakan bakteri dari tabung 2 sampai tabung 13 (kontrol positif). Lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Konsentrasi hambat minimum (KHM) ditentukan dengan mengamati adanya kekeruhan pada seri pengenceran dari sejumlah tabung yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tabung dengan larutan jernih setelah tabung keruh terakhir merupakan konsentrasi hambat minimum. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan menginokulasikan dari sejumlah tabung yang hasilnya jernih pada medium NB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri dengan melihat ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh.

#### 19. Analisis data

Data penelitian ini dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak SPSS 18 menggunakan uji *One Way ANOVA (Analysis of Varians)* dan perlu dilakukan uji lanjutan yaitu *Post Hoc Test*. Uji *Post Hoc* yang dilakukan dengan metode *Tukey*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Determinasi

Determinasi bertujuan 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. Berdasarkan hasil determinasi daun salam yang dilakukan di laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional di Karanganyar Jawa Tengah dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar daun salam (*Syzygium polyanthum*).

### 2. Hasil pembuatan dan pemeriksaan karakteristik serbuk simplisia

Serbuk daun salam yang telah kering kemudian diserbuk dengan cara diblender kemudian diayak dengan menggunakan ayakan nomer 40 mesh. Tujuan penyerbukan untuk memperluas partikel bahan yang kontak dengan pelarut sehingga penyarian dapat berlangsung secara efektif. Kemudian dilakukan uji penetapan susut pengeringan menggunakan alat *Moisture Balance* dengan suhu yang diatur 105°C. Hasil perhitungan susut pengeringan pada penelitian ini yaitu sebesar 9,24%, ini telah sesuai dengan syarat susut pengeringan yang tidak boleh lebih dari 10%. Susut pengeringan yang melebihi 10% kemungkinan dalam serbuk masih terdapat kandungan air yang banyak sehingga akan mudah ditumbuhi jamur dan mikroorganisme lain (Rivai *et al*, 2013).

### 3. Hasil Maserasi

Serbuk daun salam sebanyak 200 gram yang diperoleh dari proses penyerbukan dimasukkan dalam wadah tertutup, ditambahkan etanol 96% sebanyak 2000 ml. Maserasi dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojog, kemudian disaring dengan kain flannel sehingga diperoleh maserat. Tujuan dilakukan maserasi selama 5 hari yaitu karena semakin lama waktu ekstraksi maka semakin banyak kandungan senyawa dari simplisia yang akan terserap. Hasil maserasi diuapkan dengan evaporator sampai terbentuk ekstrak kental.

### 4. Hasil uji bebas etanol

Ekstrak daun salam dilakukan uji bebas etanol dengan esterifikasi alkohol. Hasil uji bebas etanol pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun salam sudah bebas dari pelarutnya

yaitu etanol 96% yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

5. Hasil uji kandungan kimia

Ekstrak daun salam yang diperoleh, dilakukan uji kualitatif. Analisis kualitatif menggunakan reaksi warna bertujuan untuk mengetahui senyawa yang ada pada daun salam.

Tabel 1. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun salam

Kandungan kimia	Test	Pustaka (Fisca <i>et al</i> , 2018)	Hasil	Ket
Flavonoid	Ekstrak + metanol serbuk Mg + 5 tetes HCl pekat	Terbentuk warna merah atau kuning, atau jingga.	Terbentuk warna merah	+
Saponin	Ekstrak + air + HCl 2N, kocok kuat	Terdapat busa stabil dengan ketinggian 1-3 cm selama 30 detik	Terdapat busa stabil dengan ketinggian 1-3 cm selama 30 detik	+
Tanin	Ekstrak + FeCl <sub>3</sub>	Terbentuknya war nakehitaman	Terbentuknya war naungu kehitaman	+

Uji fitokimia ini akan menunjang pengujian aktivitas senyawa aktif pada ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dalam uji antibakteri.

6. Hasil fraksinasi

Hasil ekstraksi yang telah diperoleh dari metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, 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 (Irene, 2018).

Tabel 2 Rendemen hasil fraksinasi *n*-heksan

Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Prosentase % (b/b)
10,097	2,233	22,115
10,087	2,243	21,236
10,068	2,248	22,328
Rata-rata		22,226 ± 0,001

Tabel 3 Rendemen hasil fraksinasi etil asetat

Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Prosentase % (b/b)
10,097	2,420	23,967
10,087	2,504	24,824
10,068	2,478	24,612
Rata-rata		24,467 ± 0,002

Tabel 4 Rendemen hasil fraksinasi air

Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)	Prosentase % (b/b)
10,097	2,465	24,413
10,087	2,522	25,002
10,068	2,512	24,950
Rata-rata		24,788 ± 0,003

7. Hasil uji identifikasi kandungan kimia secara KLT

Identifikasi terhadap kandungan senyawa dengan uji kromatografi lapis tipis (KLT) hanya dilakukan pada fraksi etil asetat karena fraksi ini mempunyai aktivitas antibakteri paling

aktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui beberapa senyawa antibakteri yang terkandung pada fraksi etil asetat, yaitu flavonoid, saponin dan tanin.

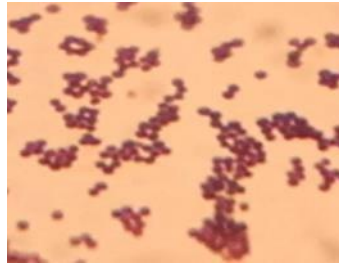
Tabel 5 Hasil identifikasi kandungan kimia secara KLT

Pengujian	Fase diam	Fase gerak	Deteksi	Pembanding	Daftar pustaka	Hasil warna bercak	Nilai Rf
Flavonoid	Silika gel	Kloroform :	UV 254	Kuersetin	Marliana,	Hijau gelap	0,82
		metanol (1:1)	UV 366		2007	Biru	0,88
Tanin	Silika gel	<i>n</i> -heksan :	UV 254	-	Hayati <i>et al</i> ,	Hijau gelap	0,77
		etil asetat (3:7)	UV 366		2010	Biru kehitaman	
Saponin	Silika gel	Kloroform :	UV 254	-	Pratama,	Hijau gelap	0,80
		etil asetat (9:1)	UV 366		<i>et al.</i> ,2012	ungu kehitaman	

Pada penelitian ini hasil identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa flavonoid. Hal ini ditunjukkan dengan bercak terlihat berwarna hijau gelap pada sinar UV 254 nm, berwarna biru pada UV 366 nm dengan nilai Rf 0,82 cm dan nilai Rf kuersetin sebagai pembanding Rf 0,88 cm (Kusnadi *et al*, 2017). Kemudian fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun salam positif mengandung senyawa tanin dengan nilai Rf 0,77 cm dari bercak pada lempeng KLT yang dilihat pada sinar UV 254 dan pereaksi semprot. Hal tersebut karena Rf yang dihasilkan memenuhi standar nilai Rf tanin yaitu 0,29 – 0,85 (Mirza, 2016). Lalu fraksi etil asetat juga positif mengandung senyawa saponin. Hal ini ditunjukkan dengan bercak terlihat berwarna ungu pada sinar UV 366 nm, dengan nilai Rf 0,80 cm. Hal tersebut karena Rf yang dihasilkan memenuhi standar nilai Rf saponin yaitu 0,57 – 0,92 (Mirza, 2016).

8. Hasil uji biokimia bakteri

Tujuan pewarnaan Gram adalah menentukan apakah bakteri uji tergolong Gram positif atau Gram negatif. Identifikasi morfologi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan pewarnaan Gram pada mikroskop perbesaran 100x menunjukkan sel berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergrombol seperti buah anggur. Sel bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 berwarna ungu membuktikan bahwa bakteri tergolong Gram positif karena bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) mempunyai peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan Gram negatif, sehingga pada pewarnaan Gram dapat mempertahankan warna ungu dari Gram A (kristal violet). Perbedaan ketebalan dinding ini mengakibatkan perbedaan kemampuan afinitas dengan pewarnaan Gram (Purves & Sadava 2003).



Gambar 1. Hasil pewarnaan gram pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

a. Hasil uji katalase

Tabel 6 Hasil uji katalase

Pengujian	Pustaka	Hasil
Katalase	Terbentuk gelembung gas	Terbentuk gelembung gas (+)

Hasil uji menunjukkan positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan terbentuknya gelembung gas. Katalase positif ditunjukkan adanya gelembung gas (O<sub>2</sub>) yang diproduksi oleh genus *Staphylococcus* (Toelle & Viktor 2014).

b. Hasil uji koagulase

Tabel 7 Hasil uji koagulase

Pengujian	Pustaka	Hasil
Koagulase	NaCl fisiologis steril diletakkan pada kaca benda	Terbentuk gumpalan granuler

Penelitian ini menunjukkan hasil positif dengan adanya gumpalan putih. Koagulase merupakan salah satu protein yang menyerupai enzim dan dapat menggumpalkan plasma sitrat dengan bantuan suatu faktor yang terdapat dalam serum (Karimela *et al*, 2017).

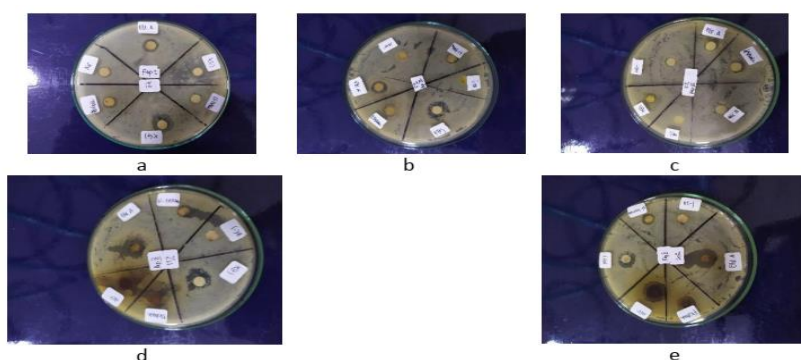
9. Hasil uji aktivitas antibakteri

Hasil dari fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun salam kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Politeknik Indonusa Surakarta dengan metode difusi. Medium yang digunakan adalah *Muller Hinton Agar* (MHA). Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram menandakan bahwa kandungan ekstrak daun salam memiliki daya hambat terhadap bakteri uji. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian ini yaitu 1%, 5%, 10% 15% dan 20%. Kontrol positif yang digunakan adalah ciprofloxacin dan DMSO 1% sebagai kontrol negatif.

Tabel 8 Diameter hambat uji aktivitas antibakteri secara difusi

Bahan uji	Konsentrasi	Daya hambat			Rata-rata (mm) ± SD
		I	II	III	
Ekstrak	1%	8	9	9	8,66±0,57
	5%	10	10	11	10,33±0,57
	10%	10	8	9	9±1,00
	15%	10	11	10	9±0,57
	20%	11	11	12	11,33±0,57
Fraksi <i>n</i> -heksan	1%	9	10	9	9,33±0,57
	5%	9	10	9	9,33±0,57
	10%	8	6	7	7±1,00
	15%	6	7	7	5,66±0,57
	20%	8	8	9	8,33±0,57
Fraksi etil asetat	1%	10	10	10	10±0,00
	5%	10	9,5	9	9,5±0,70
	10%	10	11	11,5	10,83±0,70
	15%	11	12	12	11,66±0,57
	20%	12	14	14	13,33±0,57
Fraksi air	1%	7,5	9	8	8,33±0,70
	5%	7	8	8	7,66±0,57

Bahan uji	Konsentrasi	Daya hambat			Rata-rata (mm) ± SD
		I	II	III	
	10%	10	9	9	9,33±0,57
	15%	9	10	10	9,66±0,57
	20%	11,5	11	10	11,66±0,70
Kontrol (+)	0,5%	13	12	13	12,66±0,57
	0,5%	8	9	9	8,66±0,57
	0,5%	11	10	9	10±1,00
	0,5%	12	13	13	12,66±0,57
	0,5%	13	13	14	13,33±0,57
Kontrol (-)	1%	0	0	0	0±0,00
	1%	0	0	0	0±0,00
	1%	0	0	0	0±0,00
	1%	0	0	0	0±0,00
	1%	0	0	0	0±0,00



- (a) Aktifitas antibakteri konsentrasi 1%
- (b) : Aktifitas antibakteri konsentrasi 5%
- (c) : Aktifitas antibakteri konsentrasi 10%
- (d) : Aktifitas antibakteri konsentrasi 15%
- (e) : Aktifitas antibakteri konsentrasi 20%

Gambar 2. Hasil uji difusi dengan media MHA

Hasil dari pengujian aktivitas antibakteri secara difusi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan adanya daya hambat. Sifat etil asetat yang semi polar ini menyebabkan fraksi mengandung metabolit sekunder yang lebih kompleks dibandingkan pada fraksi polar dan nonpolar. Oleh karena itu, fraksi etil asetat lebih banyak menarik senyawa 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. Mekanisme kerjanya dengan cara mengganggu sintesis DNA pada bakteri dan mengganggu metabolisme energi bakteri. Dapat diketahui bahwa ekstrak etanol daun salam, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air mempunyai daya hambat. Daya hambat dibuktikan dengan adanya daerah jernih disekitar cakram. Dengan ditunjukkan aktifitas antibakteri paling besar adalah fraksi etil asetat konsentrasi 20% dengan rata-rata diameter 13,33 mm.

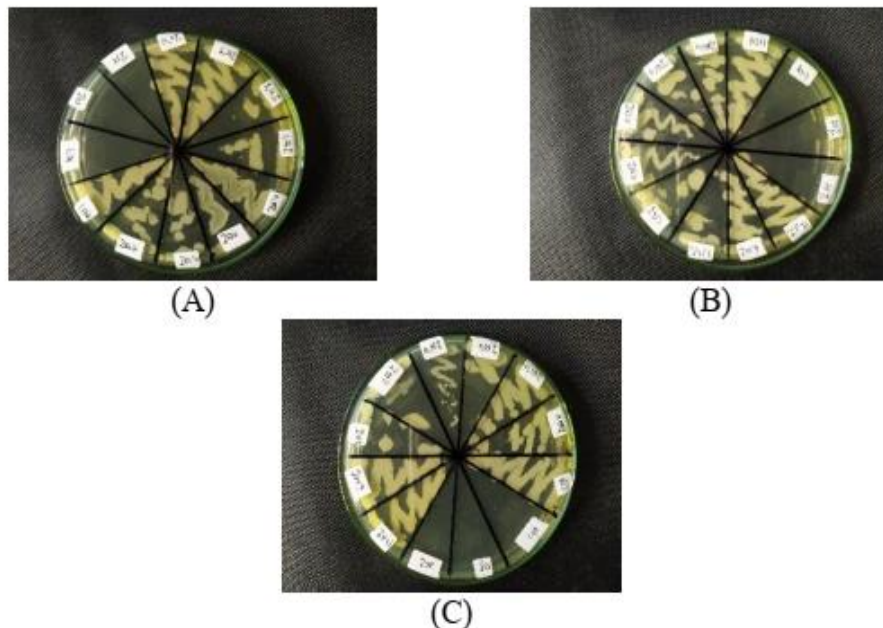
Pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat daun salam dilanjutkan dengan metode dilusi untuk melihat Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat daun salam dengan metode dilusi.

Tabel 9 Hasil inokulasi uji aktivitas antibakteri secara dilusi terhadap bakteri *s aureus*

Konsentrasi fraksi etil asetat	Replikasi		
	I	II	III
50%	-	-	-
25%	-	-	-
12,5%	+	+	+
6,25%	+	+	+
3,12%	+	+	+
1,56%	+	+	+
0,78%	+	+	+
0,39%	+	+	+
0,195%	+	+	+
0,098%	+	+	+
Kontrol normal	-	-	-
Kontrol (-)	-	-	-
Kontrol (+)	+	+	+

Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan menginokulasikan sediaan dari tabung uji pada medium selektif (MHA) dalam cawan petri. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan pada medium MHA dengan konsentrasi minimum yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Konsentrasi fraksi yang digunakan yaitu 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,095%. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat ditentukan dari kadar terendah larutan uji yang terlihat jernih. Hal ini sulit diamati karena fraksi yang digunakan terlihat pekat, sehingga perlu dilakukan inokulasi dalam medium selektif *Muller Hinton Agar* (MHA) pada masing-masing tabung untuk mengetahui konsentrasi bunuh minimum (KBM). Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dapat diketahui bahwa fraksi etil asetat memiliki konsentrasi bunuh minimum (KBM) dan konsentrasi hambat minimum (KHM) sebesar 25%.



Gambar 3. Hasil inokulasi fraksi etil asetat terhadap *S aureus*

- (a) Aktifitas antibakteri fraksi etil asetat metode dilusi replikasi 1
- (b) Aktifitas antibakteri fraksi etil asetat metode dilusi replikasi 2
- (c) Aktifitas antibakteri fraksi etil asetat metode dilusi replikasi 3

10. Hasil analisis data

Hasil uji *One-Sampel Kolmogorove-Smirnov* diperoleh signifikan  $0,200 > 0,05$  maka  $H_0$  diterima, data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji ANNOVA *one way*. Nilai probabilitas *Levene Statistic* adalah  $0,051 > 0,05$  yang artinya keempat sampel memiliki varian yang sama. Hasil signifikansi dari data uji ANNOVA adalah  $0,000 < 0,05$  yang artinya dari keempat sampel ada perbedaan konsentrasi dalam nilai diameter zona hambat. Dari hasil uji homogenitas menggunakan uji Tukey dapat dilihat dari 8 kelompok konsentrasi tersebut bisa disimpulkan bahwa konsentrasi yang memiliki daya hambat terendah adalah DMSO 1% dan konsentrasi yang memiliki daya hambat tertinggi adalah fraksi etil asetat 20%. Nilai signifikansi  $>0,05$  pada setiap kelompok menunjukkan bahwa tidak perbedaan konsentrasi yang signifikan pada setiap kelompok.

### SIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa :

- Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dari daun salam (*Syzygium polyanthum*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Fraksi etil asetat dari ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) pada konsentrasi 20% mempunyai aktivitas antibakteri teraktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, yaitu sebesar 25%.

### DAFTAR PUSTAKA

- Banu, R. H., Nagarajan, N. 2014, TLC and HPTLC fingerprinting of leaf extracts of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merrill, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(6), 29-33.
- Dewi AK. 2013. Isolasi, identifikasi dan uji sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap Amoxicillin dari sampel susu kambing peranakan ettawa (PE) penderita mastitis di wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *Jurnal Sain Veteriner* 31(2): 138-150.
- Dyah PU. 2019. Uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dan daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara *in vitro*. Universitas Setia Budi. Surakarta.
- Elok, Kamilah Hayati *Et Al.* 2010. Fraksinasi Dan Identifikasi Senyawa Tanin Pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.). *Jurnal Kimia* 4 (2), Juli 2010. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malikbrahim Malang Jl. Gajayana 50 Malang. 193-200.
- Fisca *et al.* 2018. SKRINING FITOKIMIA EKSTRAK DAUN “TEMURUP” (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) KOTA LANGSA, ACEH. *Jurnal Jeumpa*, 5 (1).
- Habib, F., R. Rind, N. Durani, A.L. Bhutto, R.S. Buriro, A. Tunio, N. Aijaz, S.A Lakho, A.G Bugti, dan M. Shoaib. 2015. Morphological and chultural characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from different animal spesies. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. (5)2:15-26.
- Harismah, K. dan Chusniatun, 2016. Pemanfaatan Daun Salam (*Eugenia Polyantha*) Sebagai Obat Herbal Dan Rempah Penyedap Makanan. *Warta Lpm*, Pp. Vol. 19 No. 2 110-118.
- Irene E, *et al.* 2008. Uji Aktifitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi *n*-Heksan, Etil Asetat, serta Air dari Daun Jambu Air (*Syzygium aqueum*) Terhadap Pertumbuhan *Eschrichia coli* ATCC 25922.
- Jawetz E, *et al.* 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi ke-23. Hartanto *et al.*, penerjemah; Jakarta: Salemba Medika.

- Karmila Umi, Karina Sofyatuddin, Yulvizar Cut. 2017. Ekstrak Kunyit *Curcuma Domestica* Sebagai Anti Bakteri *A. hydrophila* Pada Ikan Patin *Pangasius sp.* Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Kelautan dan Perikanan Universitas Syiah Kuala Darussalam, Banda Aceh. Volume 2, Nomor 1: 150-157. ISSN. 2527-6395.
- Kusuma EW & Andriani D. 2019. Karakterisasi ekstrak daun sirih merah (*Piper Ruiz & Pav*) sebagai obat antidiabetes menuju obat herbal terstandar. *Jurnal KesehatanKusumaHusada*.
- Madigan, Marthinko., Stahl., and Clark. 2012. *Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc. San Francisco. Hal 1-44.
- Marliana, E., 2007, Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Batang *Spatholobus ferrugineus* (Zoll & Moritzi) Benth yang Berfungsi sebagai Antioksidan, *Jurnal Penelitian MIPA*, Volume 1, No.1, 23-29.
- Mirza, A. 2016. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak etanol biji adas (*foeniculum vulgare mill*), rimpang kencur (*kaempferia galanga l.*), rimpang kunyit putih (*curcuma zedoaria* (berg.) roscoe), herba pegagan (*centella asiatica*) serta ramuannya. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Mulyati, Endah Sri. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Ceremai (Phyllanthus acidus (L.) Skeels) Terhadap Staphylococcus aureus Dan Escherichia coli Dan Bioautografinya*. Surakarta: Fakultas farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, 2009.
- Pertiwi N. 2010. Uji aktivitas antibakteri dan mekanisme hambat ekstrak air campuran daun piper betle L. terhadap bakteri uji[skripsi]. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Pratama, A. G. 2012. Kandungan logam berat Pb dan Fe pada air, sedimen, dan kerang hijau (*Perna viridis*) di sungai Tapak Kelurahan Tugurejo Kecamatan Tugu Kota Semarang. *Journal Of Marine Research*, 118-122.
- Praepandi. 2006. *Card System Analisa Kimia Farmasi Kualitatif*. Bandung: Seksi Diktat Stenhl. Halaman 9.
- Purves, B. dan Sadava, D. 2003. *Life The Science of Biology Seventh Edition*. Sinauer Associates Inc. New York.
- Rivai H *et al.* 2013. Karakterisasi Ekstrak Herba Meniran (*Phyllanthus Niruri* Linn) Dengan Analisa Fluoresensi. *Jurnal Farmasi Higea*. Universitas Andalas Padang. Vol. 5 No. 2.
- Toelle, Novianti Neliyani *et al.* 2014. Identifikasi dan Karakteristik *Staphylococcus Sp.* dan *Streptococcus Sp.* dari Infeksi Ovarium Pada Ayam Petelur Komersial. *Jurnal Ilmu ternak*. Politeknik Pertanian Negeri Kupang. VOL.1,NO.7,32-37
- Wibowo, Marlia Singgih, *et al.* *Uji Aktivitas Infusum Bunga Rosella (Hibiscus sabdariffa. L.)*. STIKes BTH Tasikmalaya, 2008. Yogyakarta